



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Ülari Vent

**SUVIODRA (*HORDEUM VULGARE* L.) SEEMNETES
SÄILIVATE FÜTOPATOGEENSETE SEENTE
TUVASTAMINE**

**DETECTION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI IN SPRING
BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.)**

Magistritöö
Põllumajandussaaduste tootmise ja turustamise õppekaval

Juhendajad: Riinu Kiiker, *PhD*

Kaire Loit, *MSc*

Tartu 2021

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Magistritöö lühikokkuvõte	
Autor: Ülari Vent		Õppekava: Põllumajandussaaduste tootmine ja turustamine	
Pealkiri: Suviadra (<i>Hordeum vulgare</i> L.) seemnetes säilivate fütopatogeensete seente tuvastamine			
Lehekülgi: 55	Jooniseid: 8	Tabeleid: 8	Lisasid: 7
Osakond: Taimetervise õppetool			
Uurimisvaldkond: 1.6. Põllumajandusteadus; CERCS ERIALA: B390 Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused			
Juhendaja(d): Riinu Kiiker <i>PhD</i> , Kaire Loit <i>MSc</i>			
Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu 2021			
<p>Töö eesmärkideks oli leida parim DNA eraldamise meetoodika odraseemnetes säilivate patogeensete seente tuvastamiseks ja tõestada polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhineva meetoodika tõhusust seemnetes säilivate patogeensete seente <i>Pyrenophora teres</i> ja <i>Fusarium</i> liikide tuvastamiseks. Lisaks uuriti seost odraseemnetes säilivate patogeensete seente <i>P. teres</i> ja <i>Fusarium</i> spp. esinemise ja seemnete idanevuse vahel.</p> <p>Uurimistöö läbiviimiseks koguti 2018.–2020. aastatel Ida-Virumaalt Valaste Agro ja Lüganuse Agro suviadra põldudelt seemneproove. Proovidest määrati seemnete idanevus, hinnati visuaalselt haigussümptomite esinemist ja tuvastati seemnetes <i>P. teres</i> ja <i>Fusarium</i> liikide esinemist erinevaid DNA eraldusmeetoodikaid testides.</p> <p>Seeneliikide tuvastamiseks eraldati DNA kolme erineva meetoodika alusel: CTAB, QIAGEN ja SOLIS. Võrreldi meetoodikate ajalist ja inimtööjõumahukust, eraldatud DNA kontsentratsiooni ja puhtust lahuses ning fütopatogeensete seeneliikide tuvastamise võimet. Selgus, et DNA kontsentratsioon ja puhtus sõltus olulisel määral DNA eraldusmeetoodikast.</p>			

Metoodikatest oli SOLISel teistest oluliselt kõrgem kontsentratsioon, kuid kehvem DNA lahuse puhtus. Statistiliselt erinevad tulemused DNA metoodikate vahel olid nii universaalse ITS regiooni kui ka spetsiifiliste *P. teres* praimerite kasutamisel. ITS regiooni praimerite kasutamisel olid kõik QIAGENi ja SOLISe metoodikatega eraldatud DNA-proovid positiivsed ning liigispetsiifiliste *P. teres* praimerite kasutamisel andis kõige rohkem positiivseid proove SOLISe metoodika. *Fusarium* liikide tuvastamisel statistilisi erinevusi metoodikate vahel ei tuvastatud, kuid parima tulemuse andis QIAGENi metoodika. Kõige ajamahukam, kuid väikseima tööjõuvajadusega on SOLISe DNA eraldusmetoodika.

Töö käigus analüüsiti veel *P. teres* ja *Fusarium* liikide esinemise mõju odraseemnete idanevusele. Statistiliselt parem idanevus esines *P. teres*´ega nakatunud odraseemnetel. *Fusarium* liikide esinemine avaldas idanevusele negatiivset mõju.

Märksõnad: seenpatogeenid, odrahaigused, molekulaarne identifitseerimine, võrklaiksus, *Pyrenophora teres*, fusarioos, *Fusarium*

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Üleri Vent		Specialty: Production and Marketing of Agricultural Products	
Title: Detection of phytopathogenic fungi in spring barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)			
Pages: 55	Figures: 8	Tables: 8	Appendixes: 7
Department: Chair of Plant Health Field of research: 1.6. Agricultural Sciences; CERCS SPECIALTY: B390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology Supervisors: Riinu Kiiker <i>PhD</i> , Kaire Loit <i>MSc</i> Place and date: Tartu, 2021			
<p>The aim of the study was to find the best DNA extraction methodology for the detection of phytopathogenic fungi in barley seeds and to prove the effectiveness of the PCR-based methodology for <i>Pyrenophora teres</i> and <i>Fusarium</i> species detection in seeds. Additionally, the relationship between the presence of these phytopathogenic fungi in barley seeds and seed germination was studied.</p> <p>Barley seed samples were collected from the summer barley fields of Valaste Agro and Lügänuuse Agro in Ida-Virumaa from 2018 until 2020. Seed germination was determined for the samples. The presence of disease symptoms was visually assessed and the presence of <i>P. teres</i> and <i>Fusarium</i> species in the seeds were detected using PCR methods from DNA samples extracted with three different methods.</p> <p>For phytopathogenic fungi detection DNA was extracted using three different methods: CTAB, QIAGEN and SOLIS. The time and manpower intensity of the DNA extraction</p>			

methods, the concentration and purity of the DNA in a solution, and the ability to detect phytopathogenic fungal species were compared. It was found that the DNA concentration and purity depended significantly on the DNA extraction method. Of the methods, SOLIS had a significantly higher concentration but poorer DNA purity. There were statistically different results between DNA extraction methods for both the universal ITS region and the specific *P. teres* primers. When using universal ITS region amplification, QIAGEN and SOLIS gave equally positive samples, and when using *P. teres* specific primers, SOLIS gave the best results. No statistical differences were found between the DNA extraction methods for the detection of *Fusarium* species, but QIAGEN gave the best results. The most time-consuming and least labor-intensive is the SOLIS DNA extraction process.

In the course of the work, the effect of the presence of *P. teres* and *Fusarium* species on the germination of barley seeds was also analyzed. Statistically better germination was observed in barley seeds infected with *P. teres*. The presence of *Fusarium* species had a negative effect on seed germination.

Keywords: fungal pathogens, barley diseases, molecular identification, net blotch, *Pyrenophora teres*, *Fusarium*

SISUKORD

SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1 Odra tähtsus	10
1.2 Olulisemad haigustekitajad odral	12
1.2.1 Vörklaiksus.....	13
1.2.2 <i>Fusarium</i> liikide põhjustatud haigused odral	15
1.3 Taimehaiguste tuvastamine	16
1.4 Integreeritud taimekaitse suviokra kasvatamisel	17
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	20
2.1 Odraseemneproovid.....	20
2.2 Seemnete idanevus	20
2.3 DNA eraldamine.....	21
2.4 DNA-proovide kontroll	21
2.5 Polümeraasi ahelreaktsioon	22
2.6 PCR produktide kontroll geelelektroforeesil	24
2.7 Statistilised analüüsid	24
3. TULEMUSED	25
3.1 DNA eraldamise meetodikate mõju DNA puhtusele ja kontsentratsioonile	25
3.2 DNA eraldamise meetodika mõju seeneliikide tuvastamisele	27
3.3 DNA eraldamise meetodikate ajaline kulu.....	28
3.4 Odraseemnete idanevus ja seos seenpatogeenide esinemisega	29
4. ARUTELU	30
KOKKUVÕTE	33
KASUTATUD KIRJANDUS	35
LISAD	45

Lisa 1. Uurimistöösse kaasatud 2018.–2020. aastate seemneproovide päritolu suviokra põllumassiivide kaart.....	46
Lisa 2. Suviokrasortide haiguskindlus sordikirjelduse ja katseandmete alusel	47
Lisa 3. Uuringusse kaasatud seemneproovide andmed	49
Lisa 4. DNA eraldamise protokollid.....	50
Lisa 5. DNA kontsentratsioonid ja erinevate lainepikkuste vahelised suhtarvud eraldusmetoodikate lõikes	52
Lisa 6. Haigustekitajate esinemise sagedustabel erinevate DNA eraldusmetoodikate alusel.....	53
Lisa 7. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta.....	55

SISSEJUHATUS

Otra (*Hordeum vulgare* L.) peetakse üheks vanimaks kultuurtaimeks, mille eellaseks peetakse metsikut odraliiki *H. spontaneum* (Royal Botanic Garden 2021). Kõige varasemad teadaolevad odra kasvatamise leiud pärinevad juba 8000. aastast eKr, mil seda kasvatati peamiselt inimeste ja loomade toiduks (Badr *et al.* 2000). Oma kohastumise võimelt on oder parem võrreldes maailmas enim kasvatatud teravilja nisuga (Tamm 2007). Samuti on odral efektiivsem võrsumise võime ning väiksem veevajadus kasvuperioodil (Jaama, Lauk 1999). Odra maksimaalse saagipotentsiaali saavutamisel on üheks takistuseks mitmed seemnetes säilivad seenpatogeened, nagu võrklaiksusetekitaja *Pyrenophora teres*, pruunlaiksusetekitaja *Bipolaris sorokiniana*, äärislaiksusetekitaja *Rhynchosporium commune* ja fusarioosi ning juuremädanikku põhjustavad *Fusarium* liigid (Sooväli, Koppel 2017; Sooväli, Kann 2018; Kangor *et al.* 2019; Kiiker, Sooväli 2021). Haigustekitajad mõjutavad ka seemnete idanevust (Amza 2018). Seemnepartiist patogeenide tuvastamine visuaalsete sümptomite järgi ei ole sageli piisavalt spetsiifiline ja täpne (Ward *et al.* 2004; Kumar, Gupta 2020: 107–142). Polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinevad molekulaarsed meetodikad on efektiivsed mikroorganismide tuvastamiseks erinevatest bioloogilistest materjalidest (Martinelli *et al.* 2015; Mancini *et al.* 2016; Kumar, Gupta 2020: 107–142). Lähtudes odra tähtsusest söögi- ja söödateraviljana, on oluline vähendada taimede kasvu, arengut ja saaki kahjustavate taimepatogeenide levikut. Selle magistritöö ajendiks oli aidata kaasa taimehaigustekitajate efektiivsemale tuvastamisele ja seeläbi ennetava tõrje teostamisele.

Uurimuses selgitatakse välja, kas odraseemnetes säilivate fütopatogeensete seente kindlaks tegemine erinevate DNA eraldamise meetodikate rakendamise kaudu annab erinevaid tulemusi, ning valitakse välja parim meetodika, mida edaspidi rakendada. Töös rakendatakse polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinevat meetodikat seemnetes säilivate patogeensete seente tuvastamiseks.

Vajalik uurimismaterjal pärineb Valaste Agro ja Lüganuse Agro majandatavatelt suviodra tavatootmispõldudelt Ida-Virumaal Toila ja Lüganuse vallas. Seemnepartiidest olid esindatud järgmised suviodra sordid: 'Aukusti', 'Vertti', 'Iron', 'Katniss', 'Sanette' ja 'Wolmari'.

Uurimistöö eesmärgid on:

1. Leida parim DNA eraldamise meetoodika odraseemnetes säilivate fütopatogeensete seente tuvastamiseks.
2. Tõestada polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhineva meetoodika tõhusust seemnetes säilivate patogeensete seente *P. teres* ja *Fusarium* spp. tuvastamiseks.
3. Tuvastada seos odraseemnetes säilivate patogeensete seente *P. teres* ja *Fusarium* spp. esinemise ja seemnete idanevuse vahel.

Hüpoteesid, millele uurimistöö on püstitatud:

1. Polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinevad meetoodikad on efektiivsed odraseemnetes säilivate seenpatogeenide tuvastamisel.
2. *P. teres* ja *Fusarium* spp. odraseemnetes säilimine mõjuvad seemnete idanevusele negatiivselt.

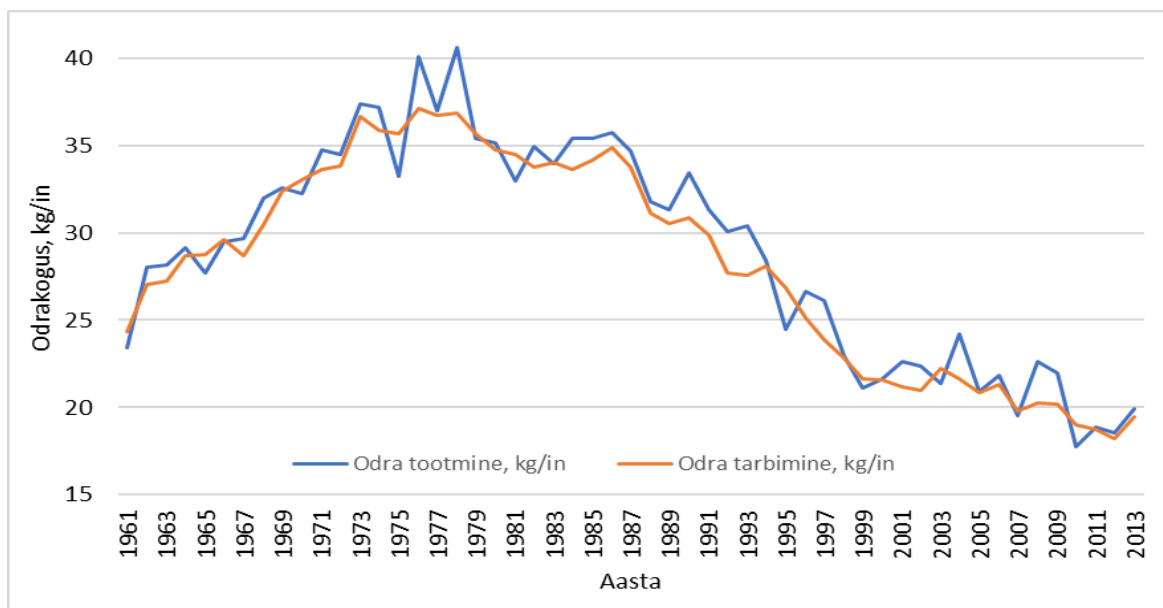
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Odra tähtsus

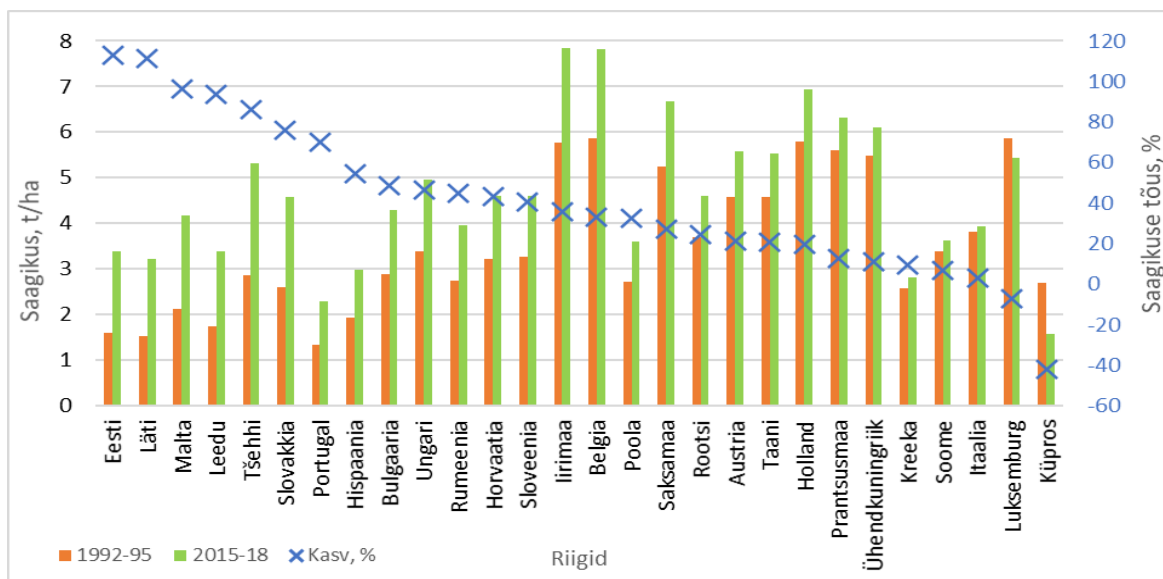
Ühendatud riikide toidu- ja põllumajandusorganisatsiooni (FAO) andmetel on oder maailmas neljas enimkasvatatav teraviljakultuur (FAOSTAT 2020). Seda kasutatakse peamiselt loomasöödaks, kuid sellest valmistatakse ka tangu, kruupe, jahu, linnaseid ja õlut (Heinsoo *et al.* 1986). Nüüdisajal kasutatakse ligikaudu 85% maailma odratoodangust loomasöödaks (McNab, Smithard 1992). Oder on populaarne toidukultuur tänu teras sisalduvatele toitainetele (valgud, rasvad, süsivesikud, mineraalained ja vitamiinid) ning nende koguselisele vahekorrale, mis on inimese organismile toitumiseks soodne (Annus 1980: 9–21). Lisaks on tehtud ka uuringuid odrast biokütusele kõlbliku toorme tootmisest (Lee *et al.* 2021).

Odra tootmine ja tarbimine ühe inimese kohta on viimase 50 aasta jooksul liikunud sarnast mustrit, paistes suurima erinevusega silma 1975.–1980. aastatel, kust edasi on jätkunud pidev langustrend (Joonis 1.) (FAOSTAT 2020). Võrreldes keskmisi saagikusi 1961.–1964. aastatel (1,48 t/ha) ja 2015.–2018. aastate (3,01 t/ha) vahel, on saagikus tõusnud enam kui kaks korda (FAOSTAT 2020). Viimase 10 aasta keskmine saagikus Euroopa Liidus on 4,5 t/ha, kõrgemad saagikused on kuni 8 t/ha Iirimaa ja Belgias, kuid Eestis tunduvalt madalam (3,2 t/ha) (Joonis 2.) (FAOSTAT 2020).

Euroopa Liidu liikmesriikidest on suurimat saagikuse kasvu näidanud peamiselt Ida-Euroopa riigid, eesotsas Eestiga, kus saagikuse tõus on olnud ligikaudu 110% võrreldes 10 aastat varasema perioodiga (Joonis 2.) (FAOSTAT 2020). Oder on viimasel kümnendil moodustanud vähem kui 40% kõikide Eestis kasvatatavate teraviljakultuuride kasvupindalast (Statistikaamet 2021). Märkimisväärse kasvupinna tõttu on Eestis alates 2003. aastast odra isevarustatuse tase kaetud (FAOSTAT 2020). Sisetarbimisest ülejääv kogus eksporditakse Eestist välja, näiteks 2019. aastal olid peamised sihtriigid Saudi-Araabia (82%), Araabia Ühendemiraadid (15,5%) ja Leedu (1,9%) ning eksporditav kogus jäi 362 000 tonni juurde (Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoda 2019).



Joonis 1. Odra tootmine ja tarbimine maailmas (kg inimese kohta) (FAOSTAT 2020).



Joonis 2. Euroopa Liidu riigid reastatud odra saagikuse kasvu vähenemise järgi (FAOSTAT 2020).

1.2 Olulisemad haigustekitajad odral

Taimehaigused põhjustavad ülemaailmselt põllumajandustööstusele suuri majanduslikke kahjusid (Martinelli *et al.* 2015). Taimehaiguste tõttu tekivad taimedel mitmesugused haigussümptomid, millega võib kaasneda kasvu pidurdumine, saagikuse ja selle kvaliteedi langus ning lõpuks taimede surm (Lõiveke, Tammaru 1995: 82–107). Eestis on odral levivateks taimehaigusteks peamiselt võrklaiksus (*P. teres*), pruunlaiksus (*B. sorokiniana*) ja äärislaiksus (*R. commune*) (Sooväli, Koppel 2017; Kangor *et al.* 2019; Kiiker, Sooväli 2021). Olenevalt kasvuaasta tingimustest ja odrasortide haiguskindlusest leidub ka kõrreliste jahukaste nakkust (*Blumeria graminis*) (Sooväli, Koppel 2017; Kangor *et al.* 2019). Lisaks võivad odrapõlde kahjustada kõrreliste juuremädanik (*Fusarium* spp., *B. sorokiniana*), silmlaiksus (*Oculimacula yallundae*), triiptõbi (*P. graminea*) ramulaaria (*Ramularia collo-cygni*) ja pähiku fusarioos (*Fusarium* spp.) (Sooväli, Kann 2018). Taliotra põlde võib kahjustada ka lumiseen (*Microdochium nivale*) (Sooväli, Kann 2018).

Äärislaiksuse haigustekitajaks on kottseen *R. commune* (varasemalt *R. secale*) (Avara, Wolfgang 2012; Arzanlou *et al.* 2016; Sooväli, Kann 2018: 30–31). Haigustekitaja nakatab nii otra, rukist kui ka teisi *Hordeum* spp. taimi (Fontaine *et al.* 2010; Avara, Wolfgang 2012). Haigustekitajale soodsal kasvuaastal võib saagikadu olla 40–65% (Williams *et al.* 2003; Beigi *et al.* 2013). Eestis tuvastati 2017.–2019. aastate taimehaiguste monitooringute käigus äärislaiksust kuni 40% taliodrapõldudel ning keskmiselt 6–19% suviodrapõldudel (Kiiker, Sooväli 2021).

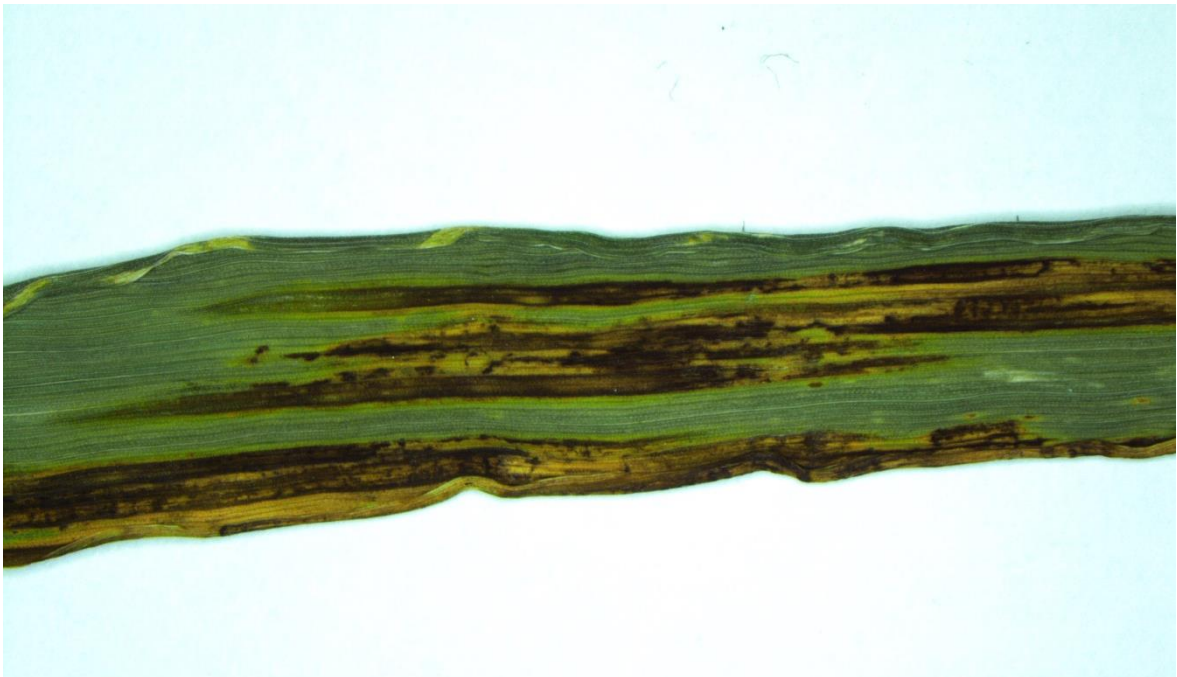
Pruunlaiksust põhjustab taimedel kottseen *B. sorokiniana* (Kumar *et al.* 2002). Lehtedele tekivad esmalt mustad täpid, mis arenedes muutuvad nekrootilisteks ovaalideks, olles ümbritsetud kollase äärisega (Matusinsky *et al.* 2010). Lisaks nekrootilistele laikudele lehtedel tekitab haigustekitaja ka juuremädanikku (Han *et al.* 2010). Haigustekitaja levib odral, nisul ja kõrrelistel heintaimedel (Misra 1979). Haigusest tingitud saagikaod varieeruvad 4–26% vahel (Ghazvini 2018). Pruunlaiksusesse nakatumist tuvastati Eestis 50–60% taliodrapõldudel 2017.–2019. aastatel (Kiiker, Sooväli 2021).

1.2.1 Vörklaiksus

Vörklaiksuse tekitajateks on *P. teres f. maculata* ja *P. teres f. teres* (anamorfid), mille telemorf on *Dreschlera teres* (Ellwood *et al.* 2010; Sooväli, Kann 2018: 20–21). Kahe erineva vormi tõttu ei ole neid võimalik morfoloogiliste tunnuste poolest teineteisest eristada (Ellwood *et al.* 2010; Sooväli, Kann 2018: 20–21). *P. teres f. maculata*’t ja *P. teres f. teres*’t on siiski võimalik eristada haigustunnuste poolest, kus esmalt mainitu tekitab taimelehtedele võrgutaolisi nekrootilisi sümptomeid ning teine musti täppe (Campell *et al.* 1999). Haigustekitaja peremeestaimeks peetakse otra (*H. vulgare*), kuid nakatumist on leitud ka teistel *Hordeum* spp. (Zhaohui *et al.* 2011). Haigustekitaja talvitub sugulise paljunemise tulemusel askosporidena peremeestaime seemnetes ja taimejäänustel, kust levib kevadel tuule ja vihmavee abil soodsa temperatuuri (10–25 °C) ning kõrge õhuniiskuse (95–100 % RH) korral kiiresti edasi (McLean *et al.* 2009; Backes *et al.* 2021; The Agriculture and Horticulture Development Board 2021). Patogeen on võimeline taimesisese haigustsükli läbima 14 päeva jooksul, pärast mida levib ta mitesugulisel paljunemisel tekkinud koniididena edasi teistele taimedele (The Agriculture and Horticulture Development Board 2021). Venemaal ja Argentiinas on tuvastatud nakatumist ka nisul (*Triticum aestivum*) (Mikhailova *et al.* 2010; Perello *et al.* 2019). Baltimaades esineb vörklaiksuse (*P. teres*) nakkust odral pea igal aastal (Joonis 3. ja 4.) (Bankina, Gaile 2009; Sooväli, Koppel 2012). Eestis olid vörklaiksusele soodsad aastad 2018 ja 2019, kui nakatunud olid üle 50% monitooringus hinnatud odrapõldudest üle Eesti (Kiiker, Sooväli 2021). Kirjanduslikes allikates on täheldatud haigustekitajast tingitud saagikadu kuni 40% (Murray, Brennan 2010; Akhavan *et al.* 2017; Backes *et al.* 2021).



Joonis 3. Tugev võrklaiksuse nakkus odrapõllul (Autor: Riinu Kiiker).



Joonis 4. Võrklaiksuse haigustunnused odra lehel (Autor: Marite Juurik).

1.2.2 *Fusarium* liikide põhjustatud haigused odral

Fusarium spp. nakatumist on tuvastatud odral (*H. vulgare* L.), nisul (*T. aestivum* L.), kaeral (*Avena sativa* L.) maisil (*Zea mays* L.) ja riisil (*Oryza sativa* L.) (Parry *et al.* 1995; Trail *et al.* 2003; Pereyra, Dill-Macky 2008). Fusarioosi (haigustekitajad *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum*) nakatumisel muutub tera pind hallikaks või pruunikaks, millele seeneniidistik annab punaka kirme (Joonis 5.) (Miller, Trenholm 1995: 37–58; Champeil *et al.* 2004; Lõiveke 2008; Boutigny *et al.* 2011). *Fusarium* liikide levikut soodustavad teraviljade lühike külvikord ja mineraalsete lämmastikväetiste kasutamine (Bernhoft *et al.* 2012). *F. graminearum*’t esineb tunduvalt rohkem minimeeritud harimise korral ja kui eelvili on olnud mais (Drakopoulos *et al.* 2021). Fusarioosi leviku jaoks soodsad tingimused on kõrge õhuniiskus (>90% RH) ja temperatuur (25°C) peremeestaimede õitsemise perioodil (Ullrich 2011: 311; The Agriculture and Horticulture Development Board 2021). Haigustekitaja talvitub olenevalt liigist kas kotteoste (suguline) või lülieostena (suguta) taimejäänustel, mullas või peremeestaime seemnetes, kust soodsatel tingimustel levib tuule ja vihmavee abil edasi (The American Phytopathological Society 2021). Haigus põhjustab olulisi saagikadusid Põhja- ja Lõuna-Ameerikas ning Euroopas (Leonard, Bushnell 2003: 241–295).

Juuremädaniku põhjustajateks on tavaliselt *F. pseudograminearum* ja *F. culmorum* (Bottalico, Perrone 2002). Haigus kahjustab taime juuri, juurekaela ja varre alumisi osasid, tekitades haiguskoldeid, mis ajapikku muutuvad pruunikateks, mille tulemusel taimekoed on pöördumatult kahjustunud (Zhukova *et al.* 2019). Haigustekitajad levivad sajuses ja alla 22°C keskkonnas (Backhouse, Burgess 2002). Saagikadu võib haiguse tõttu ulatuda kuni 50%-ni (Hollaway *et al.* 2013).

Lumiseene (*Microdochium nivale*, varasemalt *F. nivale*) kahjustuse tekkimise eelduseks taliviljapõldudel on lumikatte olemasolu talvel, millest sõltub kahjustuse ulatus (Wiese 1987; Lõiveke 2008). Haigus levib taliteraviljadel ja haigestumist on täheldatud ka teistel kõrrelistel (Lõiveke 2008). Soodsatel tingimustel võib haigus hävitada kuni 100% põllul kasvavast taimikust (Lõiveke 2008; Koppel *et al.* 2011).

Lisaks taimehaiguste põhjustamisele produtseerivad *Fusarium* spp. mükotoksiine, millest põhilised on deoksünivalenool (DON), zearalenoon (ZEN/ZON), nivalenool (NIV), moniliformiin (MON) ja beauveritsiinid (BEA), mis võivad põhjustada inimestele ja loomadele tugevaid tervisekahjustusi (Bottalico, Perrone 2002; Milicevic *et al.* 2010; Kirinčić *et al.* 2015; Akk *et al.* 2019, Drakopoulos *et al.* 2021). Mükotoksiinide tootmine sõltub ilmastikutingimustest, agrotehnilistest võtetest ja peremeestaime sordist (Brodal *et al.* 2016).



Joonis 5. Fusarioosi nakkus nisupähikutel (Autor: Riinu Kiiker).

1.3 Taimehaiguste tuvastamine

Ühel olulisemal kohal taimehaiguste tõrjumisel on haigustekitajate õigeaegne tuvastamine (Ward *et al.* 2004). Levinumaks meetodiks, mida kasutavad ka paljud põllumajandustootjad, on taimehaiguste sümptomite visuaalne vaatlemine ning selle põhjal haigustekitaja kindlaks tegemine (Ward *et al.* 2004; Mahlein 2016). Lisaks on laialdaselt kasutusel laboratoorsed meetodid, kus haigustekitajat kasvatatakse laboratoorsetes

kontrollitud tingimustes kunstlikul tardsöötmel ning seejärel tuvastatakse liik mikroskoopiliste morfoloogiliste tunnuste alusel (Sousa, Pereira 2013). Sellised meetodid võivad anda ebatäpseid tulemusi, kuna liikide morfoloogilised tunnused on sarnased ning meetodikad on seenepuhaskultuuride kasvatamise tõttu väga ajamahukad (Ward *et al.* 2004; Kumar, Gupta: 2020: 107–142). Samuti on ebatäpsed määramise tulemused tingitud haigustekitaja arengufaasist ja fütopatoloogi eelnevatest kogemustest (Newton, Hackett 1994; Nutter 2001: 312–323; Nutter *et al.* 1993; Steddom *et al.* 2005; Bock *et al.* 2008, 2010). Lisaks on palju seeneliike, mida ei saa sellise meetodi alusel laboritingimustes kasvatada ja määrata, näiteks erinevad kandseened (van Elsas *et al.* 2000).

1983. aastal leiutas Dr. Kary Mullis polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), mis lihtsustas seeneliikide tuvastamist tunduvalt (Basic science... 2017: 2; Kumar, Gupta 2020: 107–142). Protsess sarnaneb elusrakkudes toimuva DNA replikatsiooniga ning reaktsiooni läbiviimiseks piisab ka väikeses koguses bioloogilisest algmaterjalist (Caribyan, Avashia 2014; Basic science... 2017: 2). Sellised DNA-põhised meetodikad on traditsiooniliste võtete kõrval palju kiiremad (1–2 päeva), täpsemad ja tundlikud juba väga madala patogeeni hulga korral (Martinelli *et al.* 2015; Mancini *et al.* 2016). Seemnetes säilivate patogeenide puhul on väga oluline nende varajane tuvastamine juba seemnetes, et õigete ennetus- ja tõrjevõtetega reageerida (Mancini *et al.* 2016). Taimede kasvuperioodil on odra võrklaiksust põhjustava patogeeni *P. teres* kiireks tuvastamiseks odra lehtedest kasutatud kvantitatiivset PCRi (Leisova *et al.* 2006) ja tava-PCRi seenepuhaskultuuride täpseks määramiseks (Ficsor *et al.* 2014). Samuti on uuritud erinevate *Fusarium* perekonna liikide esinemist odraseemnetes, kasutades spetsiifilist kvantitatiivset PCR-metoodikat (Drakopoulos *et al.* 2021).

1.4 Integreeritud taimekaitse suviadra kasvatamisel

Integreeritud taimekaitse koosneb bioloogilistest, füüsikalistest, keemilistest või mehaanilistest võtetest, mida kasutatakse taimekaitsel ennetava või otsese tõrjena (Sooväli, Kann 2018: 6–8). Integreeritud taimekaitse eesmärk on viia taimekaitsevahendite kasutamine minimaalse tasemeni, vältides sellega liigset ohtu inimeste tervisele ja

ümbritsevale keskkonnale (Maaeluministeerium 2021). Eesti Taimekasvatuse Instituut (ETKI) on koostanud tootjatele kasutamiseks ka integreeritud taimekaitse suunised põllukultuuride järgi (ETKI 2021).

Õige viljavaheldus, künnipõhine mullaharimine ja haigustekitajate suhtes resistentsete sortide kasvatamine aitavad vältida taimejäänustel ning mullas säilivate patogeenide levimist (Jørgensen, Olsen 2007). Üks olulisemaid haiguste ennetamise meetodeid on õige külvikorra planeerimine selliselt, et samast perekonnast olevad taimeliigid ei kasvaks järjestikustel aastatel samal põllul (Ilumäe *et al.* 2006). Mehaanilise tõrjena kasutatakse enim kündmist, mille käigus viiakse taimejäänused ja muud maapinnal olevad nakkusallikad sügavamatesse mullakihtidesse (Sooväli *et al.* 2007). Taimehaigusi on võimalik vältida haiguste suhtes resistentsemate sortide aretamise ja kasvatamisega (Thirugnanasambandam *et al.* 2011). Näiteks on sordiaretusel püütud ära kasutada mõningatel metsikutel *Hordeum* spp. esinevat resistentsust võrklaiksust põhjustava *P. teres*'e suhtes, millega haigestumisel on täheldatud ainult punktitaoliste haigustunnuste lööbimist peremeestaimel (Liu *et al.* 2011). Siiski ei pruugi resistentne sort alati olla efektiivne, sest üldjuhul on sordid resistentsed ainult ühe haigustekitaja suhtes ning sealjuures võib olla samal sordil hea soodumus nakatuda mõne teiste haigustekitajaga (McRobert *et al.* 2003). Lisaks on sordiaretusel püütud aretada ka taime pikkust ja kasvukiirust, et vältida näiteks äärislaiksuse haigustekitaja (*R. commune*) koniidide sattumist sademetega mullast taime pinnale (Avara, Wolfgang 2012).

Kõige levinumaks ja efektiivsemaks taimehaiguste tõrjumise meetodiks on seemnete puhtimine ja taimiku pritsimine kasvuperioodil fungitsiididega (Older 1999: 135–137). Seemnete töötlemine sünteetiliste või bioloogiliste puhtimispreparaatidega on ennast hästi tõestanud, hävitades seemne pinnal ja sees olevad patogeenid ning stimuleerides sealjuures ka juurte arengut ja idanemist (Nameth 1998; Mathre *et al.* 2001). 2021. aasta märtsis oli Eestis turule lubatud 66 erinevat fungitsiidi suvi- ja taliodrahaiguste tõrjeks, millest 21 olid erinevad puhtimisvahendid (Põllumajandus- ja Toiduamet, 2021). Kokku turustati Eestis 2019. aastal kõige enam tebukonasooli (17 t), fenpropimorfi (11 t) ja spiroksamiini (11 t) toimeaineid sisaldavaid taimekaitsevahendeid, mida on lubatud kasutada ka suviodrahaiguste tõrjeks (Statistikaamet 2021). *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) andmetel on kõigil kolmel toimeainel tekkinud tänaseks keskmine resistentsuse risk seenhaiguste vastu (FRAC 2021). Resistentsuse vältimiseks tuleks hoolikalt järgida

taimekaitsevahendite kasutamise juhiseid ning hoiduda samal põllul korduvalt ühe toimeaine kasutamist lühikese aja jooksul (Sooväli 2011).

Haiguste tõrjel on olulisel kohal ka fungitsiidide efektiivsuse, sortide haigusresistentsuse, haigustekitajate fungitsiidiresistentsuse, leviku ja haiguste intensiivsuse hindamine, mille jälgimisega tegeletakse igal kasvuperioodil ka Eestis (Sooväli, Koppel, 2012; 2017; Mäe *et al.* 2018; 2020; Kiiker *et al.* 2021).

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Odraseemneproovid

Uuringus osalenud Valaste Agro ja Lüganuse Agro suviodrapõldudel koguti 2018.–2020. aastate koristusperioodil seemneproove 1 kg põllu üldsaagist (Lisa 1.). Kolme aasta peale kokku kaasati uuritavaid seemneproove 16, mille hulgas oli 6 erinevat suviodrasorti: 'Aukusti', 'Vertti', 'Iron', 'Katniss', 'Sanette' ja 'Wolmari' (Lisa 2.). Kasvuaja jooksul töödeldi hilisemaid suviodrasorte võrsumise (BBCH 21–29) ja viljatupe paisumise algstaadiumis (BBCH 41–45) fungitsiidiga Viverda (BASF), mis sisaldas toimeaineid boskaliid (140 g/l), püraklostrobiin (60 g/l), epoksikonasool (50 g/l) ning mille kulunorm jaotati võrdselt kahe pritsimiskorra vahel. Varajasi suviodrasorte töödeldi üks kord võrsumise faasis fungitsiididega Leander (ADAMA Makhteshim Ltd.) (fenpropidiin 750 g/l) ja Maredo 125 SC (epoksikonasool 125 g/l) seguga. Uuringupõldude mullastik oli väga varieeruv, kuid põllumassiividel esinesid mullatüüpidest leetjad mullad (KI), leostunud mullad (Ko) ja õhukesed paepealsed mullad (Kh'') (Lisa 3.) (Astover *et al.* 2013: 45–48; Maa-ameti geoportaal 2021).

2.2 Seemnete idanevus

Iga seemneproovi puhul määrati idanevus PMK seemnekontrolli laboratooriumi juhendi järgi (PMK 2021). Selleks võeti igast proovist 100 seemet, mida hoiti 7 ööpäeva +4°C juures ja seejärel idandati 7 ööpäeva Petri tassides 20–22°C juures kõrge suhtelise õhuniiskuse juures (RH>90%). Seejärel loendati idanenud seemnete hulk (Lisa 3.).

2.3 DNA eraldamine

DNA eraldamiseks kasutati kolme erinevat metoodikat: CTAB, QIAGEN ja SOLIS (Lisa 2.). DNA eraldamiseks seemnetest valmistati esmalt seemneproovid ette. Selleks võeti igast proovist 10 asümptomaatilist teraviljaseemet (0,5 g), mis pindsteriliseeriti 2% NaOCl lahuses 2 min ja loputati kaks korda puhtas destilleeritud vees 2 minutit. Seejärel koguti seemned mikrotsentrifuugituubi, kuhu lisati kolm 3 mm läbimõõduga metallkuulikest. Igast seemneproovist valmistati niimoodi ette kolm mikrotsentrifuugituubi (iga DNA eraldamismetoodika kohta üks). Järgnevalt lõhuti seemned TissueLyzer II (Qiagen, USA) raputis sagedusega 25000 Hz 5 min, pärast mida rakendati DNA eraldamismetoodikate protokolle (Lisa 4.).

2.4 DNA-proovide kontroll

Eraldamise järel kontrolliti DNA kontsentratsiooni (ng/μl) ja valguse neelduvust DNA-proovides lainepikkustel 230, 260 ja 280 nm ning nende suhete 260/230 nm ja 260/280 nm alusel hinnati DNA-proovide puhtust ja kvaliteeti (Lisa 5.). Ideaalne 260/230 nm suhe jääb vahemikku 2–2,2, sellest madalam väärtus viitab liigsetele süsivesikutele DNA-proovis, mida esineb tihti taimekudedest DNA eraldamise puhul. Ideaalne 260/280 nm suhe on ligikaudu 1,8, sellest madalamad väärtused viitavad liigsetele valkudele eraldatud DNA-proovis, suuremad väärtused (umbes 2) viitavad RNA esinemisele lahuses. Protsessi läbiviimiseks kasutati NanoDrop 2000 spektrofotomeetrit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

2.5 Polümeraasi ahelreaktsioon

Seemnetes säilivate seente molekulaarseks tuvastamiseks kasutati PCR-meetodit. Odraseemnetest eraldatud seente DNA amplifitseerimiseks koostati PCR-segu, kus kasutati seente universaalseid ITS regiooni, *Fusarium* perekonna- ja *P. teres* liigispetsiifilisi praimereid (Tabel 1. ja 2.). Iga reaktsiooni puhul lisati proovide hulka üks positiivne kontroll (*P. teres* või *F. poae* EMÜ Taimetervise õppetooli seenekultuuri kollektsioonist) ja negatiivne kontroll, kuhu DNAd ei lisatud.

Tabel 1. PCR-segu koostis erinevates PCR reaktsioonides

PCR segu komponent	Kogus ITS reaktsioonis	Kogus <i>P. teres</i> reaktsioonis	Kogus <i>Fusarium</i> I reaktsioonis	Kogus <i>Fusarium</i> II reaktsioonis
5x HOT FIREPol Blend Master Mix 12,5 mM MgCl ₂ (SolisBioDyne)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
pärisuunaline praimer (20 mM)	0,4 µl	0,4 µl	0,5 µl	0,25 µl
vastassuunaline praimer (20mM)	0,4 µl	0,4 µl	0,5 µl	0,25 µl
DNA vaba H ₂ O	18,2 µl	18,2 µl	18 µl	18 µl
DNA (10 ng/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl (I reaktsiooni produkt)

Tabel 2. PCR reaktsiooniks kasutatud praimerid

Märklauorganism	Praimeri nimetus	Nukleotiidne järjestus	Seondumis-temperatuur	Viide
seente universaalne ITS regioon	ITS1-F	5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3'	55°C	Gardes, Bruns 1993
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		White et al. 1990
<i>Fusarium</i> spp. (I reaktsioon)	Fa+7	5'-AACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3'	67°C	Karlsson et al. 2016
	Ra+6	5'-ACATACCAATGACGGTGACATAGTAGCG-3'		
<i>Fusarium</i> spp. (II reaktsioon)	Fa	5'-TCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3'	69°C	Edel-Hermann et al. 2015
	Ra	5'-CAATGACGGTGACATAGTAGCG-3'		
<i>P. teres</i>	PyrT-F	TACACCTACGCTTGACGCATG	60°C	Leisova et al. 2006
	PyrT-R	GATATCTTCATCTGCGGACCG		

Amplifitseerimine toimus Mastercycle flexid nexus (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa) masinas. PCR põhineb tsüklilisel PCR-segu kuumutamisel erinevatel temperatuuridel

(Tabel 3.). Protsess algab eelkuumutamise ja DNA paljundamise tsüklitele järgneb lisasünteesi etapp.

Tabel 3. PCR reaktsiooni protsess ITS regiooni ja *P. teres* praimeritega

Reaktsiooni etapp	Temperatuur, °C		Etapi pikkus	Korduste arv	
	ITS	<i>P. teres</i>		ITS	<i>P. teres</i>
Eelkuumutamine	95	95	15 minutit	1	1
Denaturatsioon	95	95	15 sekundit	35	40
Praimerite seondumine	55	60	30 sekundit		
DNA süntees	72	72	30 sekundit		
Lisasüntees	72	72	5 minutit	1	1

Fusarium spp. määramisel viidi läbi *nested*-PCR ehk pesastatud PCR reaktsioon, mis toimub kahes etapis. Esimesse PCR-segusse lisati seemneproovide DNA ning teise reaktsiooni puhul kasutati esimese PCR reaktsiooni produkti algse DNA asemel (Tabel 4.).

Tabel 4. PCR reaktsiooni protsess *Fusarium* spp. spetsiifiliste praimeritega

Reaktsiooni etapp	Temperatuur, °C	Etapi pikkus	Korduste arv
I Reaktsioon			
Eelkuumutamine	95	15 minutit	1
Denaturatsioon	94	1 minut	30
Praimerite seondumine	67	1 minut	
DNA süntees	72	1 minut	
Lisasüntees	72	10 minutit	1
II Reaktsioon			
Eelkuumutamine	95	15 minutit	1
Denaturatsioon	94	1 minut	30
Praimerite seondumine	69	1 minut	
DNA süntees	72	1 minut	
Lisasüntees	72	10 minutit	1

2.6 PCR produktide kontroll geelelektroforeesil

DNA hulga ja fragmentide pikkuste kindlaks tegemiseks PCR proovides teostati geelelektroforees. 1,5% agarosgeelile lisati $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ kontsentratsiooniga etiidiumbromiidi (EtBr) 1x TBE (Tris-boraat) puhvril. Geeli hambasse kanti 5 μl uuritavat PCR proovi. Tulemuse hindamiseks kasutati võrdlusena 1 kb suurust DNA markerit (GeneRuler TM; Fermentas; Leedu). Geelelektroforees viidi läbi 1x TBE puhvril 150 V juures 25 minuti jooksul. Tulemust pildistati UVIDOC HD6 UV transilluminaatoris (Cleaver Scientific Ltd, UK).

2.7 Statistilised analüüsid

Saadud tulemuste statistiliste erinevuste tõestamiseks kasutati statistikatarkvara R (BlueSky Statistics, USA) ja GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software, USA). Kõikidel testidel oli statistilise olulisuse piirmäär 95% ($p < 0,05$). Esmalt kontrolliti andmete normaaljaotusele vastavust kirjeldava statistika abil. DNA puhtuse ja kontsentratsiooni erinevuste hindamisel erinevate meetodikate vahel ei olnud tegemist normaaljaotusega ja asjakohasem oli kasutada Kruskal-Wallis testi, millele lisaks teostati Dunn'i mitmese võrdluse test. Seeneliikide tuvastamise võrdlusel erinevate meetodikate vahel kasutati hii-ruut testi. Odraseemnete idanemuse ja patogeenide esinemise vahelise seose kindlaks tegemiseks kasutati Welchi t-testi.

3. TULEMUSED

3.1 DNA eraldamise metoodikate mõju DNA puhtusele ja kontsentratsioonile

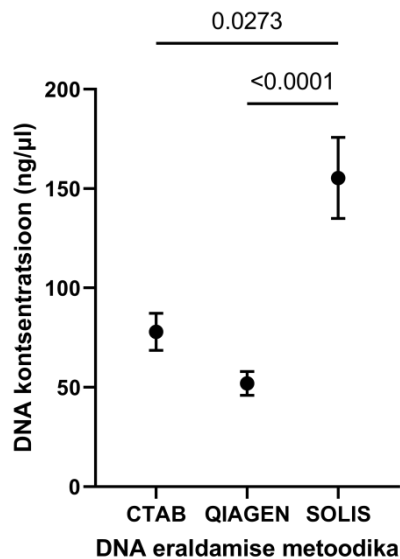
Odra seemneproovidest eraldati DNA kolme erineva metoodikaga (Lisa 4.). Esiteks kasutati CTAB lüüsi protokoll, mida on maailma laborites palju kasutatud taime ja seene DNA eraldamiseks. Sellele lisaks tehti DNA puhastamine läbi kolonnfiltrite kommertsiaalse DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, CA, USA) komplekti abil. CTAB metoodikaga DNA eraldamine ebaõnnestus viiest proovist (nr. 11, 12, 13, 19, 20), mida tõestas DNA lahuse nullilähedane kontsentratsioon ja seente üldpraimeritega ITS regiooni amplifikatsiooni ebaõnnestumine (Lisa 5. ja 6.). QIAGENi metoodika põhineb kommertsiaalse DNA eraldamise komplekti Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kasutamisel, mis sisaldab DNA lüüsimist, sidumist, puhastamist ja elueerimist läbi kolonnfiltrite. SOLISE metoodika puhul eraldatakse DNA termolüüsimismeetodil, kasutades Solis Biodyne kümnekordset lüüsilahust ilma puhastamise etapita. QIAGENi ja SOLISE metoodikaga õnnestus kõikide proovide DNA eraldamine (Lisa 5. ja 6.).

Analüüsi tulemusel selgus, et DNA kontsentratsioon proovis sõltub olulisel määral DNA eraldamise metoodikast ($F_{2,43}=24,2$; $p<0,001$). SOLISE metoodikaga oli DNA saagis oluliselt suurem võrreldes CTABi ($p=0,027$) ja QIAGENi metoodikatega ($p<0,001$) (Tabel 5.; Joonis 6.; Lisa 5.).

Tabel 5. DNA keskmine kontsentratsioon (ng/μl) sõltuvalt eraldamise metoodikast

Meetod	n	Keskmine±se	Mediaan
CTAB	11	77,91 ^a ±9,37	78,25
QIAGEN	16	51,96 ^a ±6,02	47,33
SOLIS	16	155,40 ^b ±20,37	141,08

Märkus ^{a,b} – Erinevate tähtedega on märgitud usutavalt erinevad ($\alpha<0,05$) keskmised väärtused.



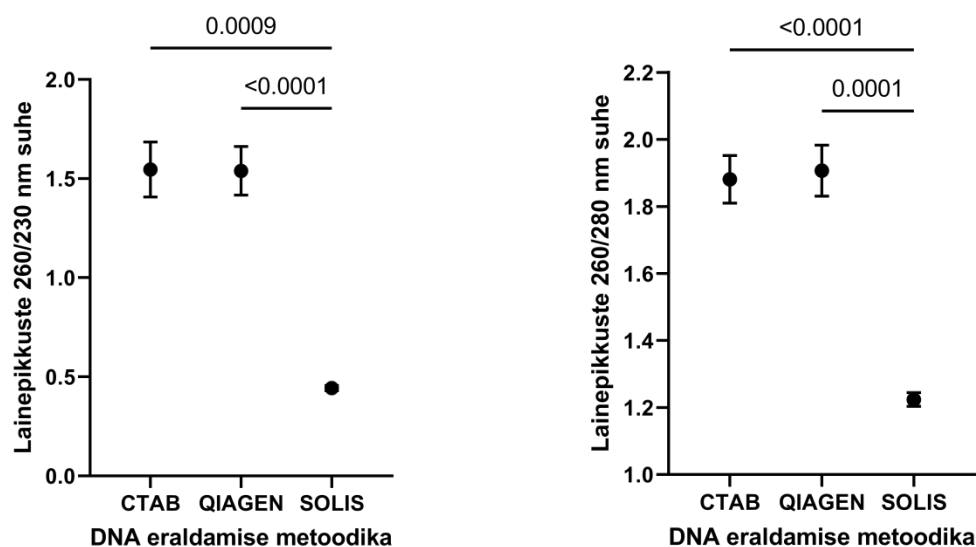
Joonis 6. DNA keskmised kontsentratsioonid koos standardveaga ja usutavad erinevused meetodikate vahel.

DNA puhtus oli oluliselt erinev DNA eraldamise meetodikate vahel lainepikkuste suhete 260/230 ($F_{2,43}=21,44$; $p<0,001$) ja 260/280 ($F_{2,43}=28,27$; $p<0,001$) korral, kuna kõikide SOLISE meetodikaga eraldatud DNA-proovide 260/230 nm ja 260/280 nm suhted olid väga madalad (Joonis 7.; Lisa 5.). Ideaalsele kõige lähedasem puhtus oli DNA-proovidel, mis saadi kasutades QIAGENi meetodikat, lainepikkuste 260/230 suhe oli keskmiselt 1,54 ja 260/280 suhe keskmiselt 1,9 (Tabel 6.). QIAGENi meetodika puhul oli enamiku DNA-proovide 260/280 nm suhe umbes 1,8, mis vastab ideaalsele DNA puhtusele. Kuid ainult ühel DNA-proovil, mis oli eraldatud QIAGENi meetodikaga, jäi 260/230 nm suhe soovitud vahemikku (Lisa 5.). CTABi meetodika puhul oli kuue proovi 260/280 nm suhe umbes 2, mis on seletatav sellega, et selle meetodika puhul ei tehtud RNAd hüdrolyüsiva ribonukleaasi (RNAas) töötlust ja eraldatud lahuses on nii DNA kui ka RNA.

Tabel 6. DNA-proovide 230/260 ja 260/280 lainepikkuste suhe sõltuvalt eraldamise meetodikast

Meetod	n	260/230 Keskmine±se	260/230 Mediaan	260/280 Keskmine±se	260/280 Mediaan
CTAB	11	1,55 ^a ±0,14	1,77	1,88 ^a ±0,07	1,98
QIAGEN	16	1,54 ^a ±0,12	1,64	1,91 ^a ±0,08	1,83
SOLIS	16	0,44 ^b ±0,01	0,43	1,22 ^b ±0,02	1,22

Märkus ^{a,b} – Erinevate tähtedega on märgitud usutavad erinevused keskmiste vahel.



Joonis 7. Erinevate lainepikkuste keskmised suhted koos standardveaga ja usutavad erinevused keskmiste vahel erinevate meetodikate lõikes.

3.2 DNA eraldamise meetoodika mõju seeneliikide tuvastamisele

PCR tulemuste põhjal on koostatud sagedustabel seente üldise ITS regiooni, *P. teres* liigi ja *Fusarium* spp. esinemise kohta seemneproovides vastavalt kasutatud DNA eraldamise meetoodikale (Lisa 6.).

Selgus, et ITS regiooni ($\chi^2=11,2$; $p=0,004$) ja *P. teres* liigi ($\chi^2=6,9$; $p=0,031$) tuvastamisel sõltub saadav tulemus oluliselt DNA eraldamise meetoodikast. *Fusarium* spp. ($\chi^2=2,2$; $p=0,336$) tuvastamisel ei sõltunud saadud tulemus DNA eraldamise meetoodikast. Kõige

rohkem *P. teres* positiivseid DNA-proove tuvastati SOLISE eraldamise korral ja enim *Fusarium* spp. positiivseid proove saadi QIAGENi metoodikaga (Tabel 7.). CTABi eraldamise metoodika andis seente DNA amplifitseerimisel halvima tulemuse, kui ainult kahes proovis tuvastati *P. teres*. See oli seotud sellega, et DNA eraldamine ebaõnnestus proovides nr. 11, 12, 19 ja 20, millest teiste DNA eraldamise metoodikate kasutamise tulemusel oli võimalik *P. teres*’t edukalt määrata (Lisa 6.). Kokku oli 10 DNA-proovi (nr. 1, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 19), mis andsid samas proovis positiivse tulemuse *P. teres* ja *Fusarium* spp. määramisel (Lisa 6.).

Tabel 7. Positiivsete proovide arv amplifitseeritud erinevate praimeripaaridega DNA eraldamise metoodikate kaupa

Meetod	ITS	<i>Pyrenophora teres</i>	<i>Fusarium</i> spp.
CTAB	11	2	8
QIAGEN	16	7	11
SOLIS	16	9	7

3.3 DNA eraldamise metoodikate ajaline kulu

DNA eraldamise metoodikate puhul on olulisel kohal kogu protsessi ajaline pikkus. Tihti võib metoodika valikul määravaks teguriks olla protsessi pikkus, kui tööaeg on piiratud või kui tulemusi on vaja saavutada võimalikult kiiresti näiteks patogeeni kiireks ja efektiivseks tuvastamiseks. Kõik kolm uuritavat eraldusmetoodikat olid ajaliselt mahult erinevad (Tabel 8.). Kõige kauem võttis aega SOLISE metoodika läbiviimine (430 min), kuid sealjuures tuleb mees pidada, et selle metoodika puhul on üksiketappide arv kõige väiksem (Lisa 4.) ja inimtööjõudu tuleb rakendada kõige vähem, kuna lüüsimise etapp (400 min) ei vaja töötajapoolset sekkumist. Vajaduse korral on võimalik ka SOLISE lüüsimise etappi protokollis edasise optimeerimisel lühendada. Teiste metoodikate (CTAB ja QIAGEN) teostamisel on küll kogu ajakulu väiksem, aga protsessietappide teostamine vajab pidevat juuresolekut, laboritöötaja sekkumist ja pipeteerimist. Üksiketappide arvu poolest oli kõige

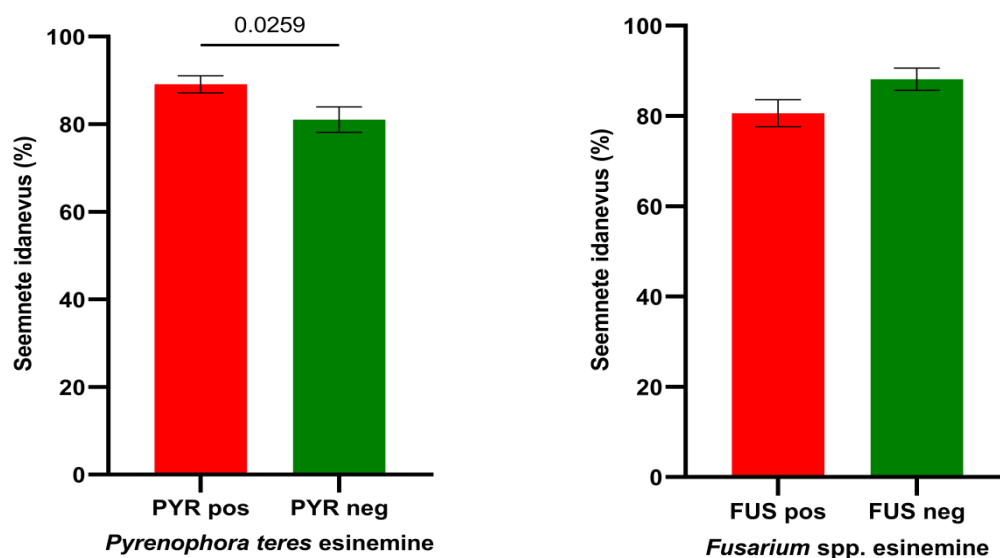
mahukam QIAGENi metoodika (Lisa 4.), mistõttu võib protsessi puhul ka kõige rohkem inimlikke vigu tekkida.

Tabel 8. DNA eraldamismetoodikate protsesside ajaline kulu (min)

Metoodika	Proovide arv	Purustamine	Lüüsimine	Sadestamine	Puhastamine	Elueerimine	Kokku
CTAB	16	10	60	60	110	20	260
QIAGEN	16	10	40	10	10	20	90
SOLIS	16	10	400	-	-	20	430

3.4 Odraseemnete idanevus ja seos seenpatogeenide esinemisega

Odraseemnete idanevusele *P. teres* esinemine negatiivselt ei mõjunud. Keskmine idanevus oli *P. teres*’ga seemneproovides 89% ja *P. teres* negatiivsetes proovides 81%. Statistiliselt oluliselt madalam oli seemneproovide idanevus, kus *P. teres*’t ei tuvastatud ($t=2,3$; $p=0,026$) (Joonis 8.). *Fusarium* seente esinemine odraseemnetes vastupidi mõjutas idanevust negatiivselt, kuid mitte statistiliselt oluliselt ($p=0,059$). *Fusarium* spp. nakatunud proovide keskmine idanevus oli 81% ja negatiivsetel proovidel 88% (Joonis 8.).



Joonis 8. Odraseemnete keskmine idanevus koos standardveaga sõltuvalt *P. teres* või *Fusarium* spp. esinemisest seemneproovides.

4. ARUTELU

Taimehaigused põhjustavad teraviljadel suurt saagikadu ja kvaliteedi langust (Lõiveke, Tammaru 1995: 82-107). 2017.–2019. aastate üle-eestilise taimehaiguste monitooringu andmetel esines suviudrapõldudel taimede arengule ja saagipotentsiaalile negatiivset mõju avaldavaid taimehaigusi: võrklaiksus (*P. teres*), pruunlaiksus (*B. sorokiniana*), äärislaiksus (*R. commune*) ja kõrreliste jahukaste (*B. graminis*) (Kiiker, Sooväli 2021). Erinevate kirjanduslike allikate alusel on teada, et olenevalt taimesordist ja soodsatest ilmaoludest on erinevad haigustekitajad võimelised kärpima saagipotentsiaalid 4–100% (Williams *et al.* 2003; Lõiveke 2008; Murray, Brennan 2010; Koppel *et al.* 2011; Hollaway *et al.* 2013; Beigi *et al.* 2013; Akhavan *et al.* 2017; Ghazvini 2018; Backes *et al.* 2021). On täheldatud, et taimehaigused piiravad odral 12–15% ja nisul 20–50% saagipotentsiaalid (Oerke 2006; Murray, Brennan 2010). 2017. aastal suudeti Eestis võimalikust odrasaagist realiseerida umbes 50% (Statistikaamet 2021; PMK 2021). Seega on taimehaigustekitajate tuvastamisel ja nende leviku piiramisel erinevate ennetus- ja tõrjevõtetega oluline roll saagi paremaks realiseerimisel.

Haigustekitajaid ei ole võimalik taimekudede nakatumise algusperioodil tuvastada sümptomite puudumise tõttu (Sarpeleh *et al.* 2007). Näiteks avalduvad soodsates tingimustes võrklaiksuse esimesed haigustunnused, mustad täpid taime lehtedel, 72 tundi pärast nakatumist ning lehevärvuse muutus ja nekroos toimub alles 168 tunni ehk 7 ööpäeva möödudes (Sarpeleh *et al.* 2007). Seetõttu on haiguste tuvastamine varajases faasis visuaalsete meetodite abil pigem võimatu. Haiguse peiteperiood võib sõltuda ka õhutemperatuurist, peremeestaime kasvustaadiumist ning resistentsusest (Kumar *et al.* 2011; Zearfoss *et al.* 2011; Suffert, Thompson 2018;). Molekulaarsete meetodite abil on võimalik kiirelt tuvastada haigustekitajaid peremeestaime kudedest ja seemnetest DNA replikatsiooni abil ja seeläbi ennetada nende levikut (Caribyan, Avashia 2014; Martinelli *et al.* 2015; Mancini *et al.* 2016; Basic science... 2017: 2). Patogeenide varajane tuvastamine teraviljaseemnetes juba enne külvamist aitab teha põllumajandustootjal asjakohase otsuse süsteemse puhtimispreparaadi valikul, et kaitsta seemet ja toetada taimede kiiremat algarengut (Sooväli *et al.* 2015). Haigustekitajate määramine molekulaarsete meetoditega on oluline ka inimeste ja loomade toiduks kasutatavast saagise puhul, kuna mitmed

haigustekitajad (*Fusarium* spp.) produtseerivad erinevaid mükotoksiine (DON, ZEN, ZON, NIV, MON, BEA), mis kahjustavad tervist (Bottalico, Perrone 2002; Kirinčić *et al.* 2015; Akk *et al.* 2019).

Uurimistöös kasutati haigustekitajate tuvastamiseks odraseemnetest kolme erinevat DNA eraldamise meetodikat, millest statistiliselt oluliselt parema kontsentratsiooni, ITS regiooni ja *P. teres* tuvastamise poolest osutus sobilikumaks SOLISE meetodika (Tabel 5. ja 7.). Ajaliselt oli SOLISE eraldusmeetodika küll mahukaim, kuid lüüsimise protsess (400 min.) oli automatiseeritud ja kogu protsess nõudis vähim inimtööjõudu ning sekkumist (Tabel 8.). SOLISE lüüsimetoodikat on DNA eraldamiseks kasutatud edukalt ka erinevates teadustöodes taimekudedest patogeenide DNA eraldamiseks (Loit *et al.* 2019) ja seenepuhaskultuuride DNA eraldamiseks (Anslan *et al.* 2016). ITS regiooni ja *P. teres* tuvastamisel andis statistiliselt oluliselt kehvema tulemuse CTABi meetodika, mis tulenes DNA eraldamise ebaõnnestumisest neljas seemneproovis (Lisa 6.). Samas kasutatakse CTABi meetodika erinevaid versioone paljudes teaduslaborites samuti teraviljaseemnetest DNA eraldamiseks (Mořková, Vytrasova 2011; Nicolaisen *et al.* 2014).

Haigustekitajate esinemine seemnetes avaldab negatiivset mõju idanevusele (Amza 2018). Näiteks *Fusarium* perekonna erinevate liikide puhul on täheldatud seemnete idanevuse vähenemist 8–38% (Browne, Cooke 2005). Uurimistöös *Fusarium* spp. esinemine odraseemnete idanevusele statistiliselt olulist mõju ei avaldanud ($p=0,059$) (Joonis 8.). *P. teres* esinemine odraseemnete idanevusele negatiivselt ei mõjunud (Joonis 8.), kuid samas võib *P. teres* põhjustada suurt majanduslikku kahju, mõjutades seemnete kvaliteeti negatiivselt. Näiteks õlletootmiseks kasutatava odra puhul on oluline kõrgem süsivesikute ja madalam valkude sisaldus, mida *P. teres* esinemine seemnetes negatiivselt mõjutab (Jayasena *et al.* 2007). *P. teres* ja *Fusarium* seentega nakatunud odraseemnete kasutamine õlletootmises on põhjustanud probleeme õlle valmistamise protsessis liigse vahutamisega, mida võivad põhjustada seente produtseeritud hüdrofoobsed valgud (Gjersten 1967; Bamforth 2009).

Põllumajandustootja jaoks on oluline rakendada patogeenide suhtes sobilikke ennetus- ja tõrjestrategiaid (Kiiker, Sooväli 2021). Seemnetes säilivate patogeenide, näiteks *P. teres* ja *Fusarium* spp. tõrje puhul on efektiivsed süsteemsed puhised, mis toetavad taime arengut ja parandavad taimetervist (Sooväli *et al.* 2015). Taimejäänustel ja mullas säilivate patogeenide (*P. teres*, *Fusarium* spp.) vähendamiseks põllumajandusmaal on oluline

rakendada künnipõhist maaharimist, järgida viljavaheldust, teha õigeaegset tõrjet enne haigustekitajate ulatuslikku levikut, kasutada efektiivseid fungitsiidipreparaate ja valida kasvatamiseks haiguskindlaid sorte (Jørgensen, Olsen, 2007). Näiteks oli uurimuses kaasatud suvioldrasort 'Sanette', mis on vastuvõtlikum võrklaiksusele ja millel tuvastati *P. teres* nakkust kõikides proovides, kuid samas esines *P. teres* ka sordi 'Wolmari' proovides, mis on sordiaretaja andmetel võrklaiksuse suhtes vähem vastuvõtlik (Lisa 2 ja 6.). Sortide valimise teeb keeruliseks see, et kompleksset resistentsust mitmete seenhaiguste suhtes on keeruline saavutada (McRobert *et al.* 2003). Nisu sordiaretusel on täheldatud, et jahukastele vastupidavamad sordid on pigem vastuvõtlikud hele- ja pruunlaiksuse suhtes (McRobert *et al.* 2003). Taimede vastuvõtlikkust haiguste suhtes mõjutavad omakorda ka külviaeg ja -tihedus, mida tuleb erineva haiguskindlusega sortide kasvatamisel arvestada (Jørgensen *et al.* 2014).

KOKKUVÕTE

Seemnetes säilivate seenpatogeenide tuvastamiseks koguti Valaste Agro ja Lügänu Agro suviõndradelt 2018.–2020. aastatel seemneproove. Töö eesmärkideks oli esiteks valida välja parim DNA eraldamise meetodika odraseemnetes säilivate fütopatogeensete seente tuvastamiseks, teiseks tõestada polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhineva meetodika tõhusust seemnetes säilivate patogeenide seente *P. teres* ja *Fusarium* spp. tuvastamiseks, kolmandaks uurida seost *P. teres* ja *Fusarium* spp. esinemise ja seemnete idanevuse vahel.

Uurimistöös selgus, et erinevate DNA eraldamise meetodikatega on võimalik edukalt seemnes säilivate fütopatogeensete seente DNA-d odraseemnetest eraldada. Statistiliselt erinevad tulemused meetodikate vahel esinesid ITS regiooni ja *P. teres* praimerite kasutamisel, kus teistest paremaid tulemusi andis SOLISE meetodika. *Fusarium* spp. tuvastamisel ei täheldatud statistiliselt usutavaid erinevusi DNA eraldusmeetodikate vahel, kuid kõige rohkem positiivseid tulemusi andis QIAGEN. DNA lahuse kontsentratsioon oli teistest oluliselt kõrgem SOLISE meetodikaga. Võrreldes DNA lahuse neelduvust erinevatel lainepikkustel ning nende põhjal arvutatud suhtarve 230/260 ja 280/260 saab öelda, et DNA lahuse puhtuse ja kvaliteedi osas esines meetodikate vahel statistiliselt usutavaid erinevusi. Meetodikatest saavutas kõige madalama puhtusega DNA lahuse SOLISE meetodika. Kõige ajamahukamaks meetodikaks kujunes SOLIS, kuna lüüsimise protsess oli ajaliselt kõige pikem. Kuna lüüsimise protsess on automatiseeritud, nõudis SOLISE meetodika kõige vähem inimtööjõudu rakendamist võrreldes teiste meetodikatega.

Seemnetes säilivate fütopatogeensete seente *P. teres* ja *Fusarium* spp. esinemist võrreldi odraseemnete idanevusega. Odraseemned, kus esines *P. teres*, olid parema idanevusega võrreldes *P. teres* suhtes negatiivsete seemneproovidega. *Fusarium* spp. avaldas seemnete idanevusele negatiivset mõju, kuid statistiliselt usutavat erinevust *Fusarium* positiivsete ja negatiivsete seemneproovide vahel ei esinenud.

Selle töö tulemustest lähtuvalt võib soovitada odraseemnetes säilivate fütopatogeensete seente määramiseks rakendada DNA eraldamiseks SOLISE termolüüsimetoodikat ja patogeenide seente molekulaarset määramist PCR meetodikaga. Vajalik oleks veel ka teiste seemnetes säilivate patogeenide (näiteks *R. secalis*, *B. sorokiniana*, *R. collo-cygni*)

molekulaarse määramise protokollide väljatöötamine ja nende omavaheline kombineerimine. Sellise määramismetoodika kasutamine on oluline kontrollimaks taimehaigustekitajate esinemist ja levikut ning võimaldaks efektiivsemalt erinevate ennetus- ja tõrjevõtetega odra saagipotentsiaali ja kvaliteeti tõsta.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Akhavan, A., Strelkov, S. E., Askarian, H., Kher, S. V., Fraser, M., Kutcher, H. R., Turkington, T. K.** (2017) Sensitivity of western Canadian *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* isolates to propiconazole and pyraclostrobin – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 39, pp. 11–24.
- Akk, E., Edesi, L., Talve, T., Islamov, B., Kütt, M-L., Luringson, E., Ilumäe, E., Tamm, K.** (2019). Mükotoksiinid ja fusarium seened teraviljades – ülevaade tingimustest – *Agronomia*. Koost. I. Tupits, S. Tamm, Ü. Tamm, A. Toe. Jõgeva: Vali Press, lk 117–128.
- Amza, J.** (2018). Seed borne fungi; food spoilage, the negative impact, and their management: A Review – *Food Science and Quality Management*. Vol. 81, pp. 70–79.
- Annual population: Population – The Food and Agriculture Organization.
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/OA> (20.11.2020).
- Annus, H.** (1980). Teraviljakasvatuse Eestis. Tallinn: Valgus, 444 lk.
- Anslan, S., Bahram, M., Tedersoo, L.** (2016). Temporal changes in fungal communities associated with guts and appendages of Collembola as based on culturing and high-throughput sequencing – *Soil Biology & Biochem.* Vol. 96, pp. 152–159,
- Arzanlou, M., Kaivan, K., Fariba, M.** (2016). Some Evidence for Skewed Mating Type Distribution in Iranian Populations of *Rhynchosporium commune*, the Cause of Barley Scald Disease – *Journal of Plant Protection Research*. Vol. 56, No. 3, pp. 237–43.
- Astover, A., Reintam, E., Leedu, E., Kõlli, R.** (2013). Muldade väliuurimine. Tartu: Eesti Loodusfoto, 70 lk.
- Avispeamees. Sordikirjeldused. [veebileht]
http://www.avispeamees.ee/failid/sordikirjeldused/AUKUSTI_sordikirjeldus_et.pdf
(14.03.2021)
- Avora, A., Wolfgang, K.** (2012) *Rhynchosporium commune*: a persistent threat to barley cultivation – *Molecular Plant Pathology*. Vol. 13, No. 9, pp. 986–997.
- Backes, A., Guerriero, G., Barka, E. A., Jacquard, C.** (2021). *Pyrenophora teres*: Taxonomy, Morphology, Interaction With Barley, and Mode of Control – *Frontiers in Plant Science*. Vol. 12, pp. 1–18
- Backhouse, D., Burgess, L. W.** (2002). Climatic analysis of the distribution of *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum* on cereals in Australia – *Australasian Plant Pathology*. Vol. 31, Issue. 4, pp. 321–327.

- Badr, A., M. K., Sch, R., Rabey, H. El., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F.** (2000). On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*) – *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 17, No. 4, pp. 499–510.
- Baltic Agro. Söödaoder Iron. [veebileht]
<https://www.balticagro.ee/seemned/suviteravili/soodaoder-iron> (14.03.2021)
- Baltic Agro. Söödaoder Katniss. [veebileht]
<https://www.balticagro.ee/seemned/suviteravili/soodaoder-katniss> (14.03.2021)
- Bamforth, C. W.** (2009). Beer: A Quality Perspective. Amsterdam: Academic Press. 288 pp.
- Bankina, B., Gaile, Z.** (2009). Evaluation of barley disease development depending on varieties. – *Agronomy Research* 7 Vol. 7, No. Special issue I, pp. 198–203.
- Barley, 2013–2020, Official variety trials: Plant disease – *Natural Resources Institute Finland*.
http://px.luke.fi/PXWeb/pxweb/en/maatalous/maatalous__lajikekoost__julkaisuvuosi_2020__tauti/?tablelist=true (27.03.2021)
- Basic science methods for clinical researchers. (2017). /Eds. Jalali, M., Saldanha, F., Jalali, M. USA: Academic Press. 382 p.
- Beigi, S., Zamanizadeh, H.R., Razavi, M., Zare, R.** (2013) Genetic Diversity of Iranian Isolates of Barley Scald Pathogen (*Rhynchosporium secalis*) Making Use of Molecular Markers – *Journal of Adhesion Science and Technology*. Vol. 15, pp. 843–854.
- Bernhoft, A., Torp, M., Clasen, P-E., Løes, A-K., Kristoffersen, A. B.** (2012). Influence of agronomic and climatic factors on Fusarium infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. – *Food Additives and Contaminants*. Vol. 29, Issue. 7, pp. 1129–1140.
- Bock, C. H., Parker, P. E., Cook, A. Z., Gottwald, T. R.** (2008). Visual rating and the use of image analysis for assessing different symptoms of citrus canker on grapefruit leaves – *Plant Disease*. Vol. 92, No. 4, pp. 530–541
- Bock, C. H., Poole, G. H., Parker, P. E., Gottwald, T. R.** (2010). Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral Imaging – *Critical Reviews in Plant Sciences*. Vol. 29, Issue. 2. pp. 59-107
- Boreal. Vertti. [veebileht] <https://boreal.fi/lajikkeet/vertti/> (27.03.2021)
- Boreal. Wolmari. [veebileht] <https://boreal.fi/lajikkeet/wolmari/> (14.03.2021)
- Bottalico, A., Perrone, G.** (2002). Toxigenic Fusarium species and Mycotoxins Associated with Head Blight in Small-Grain Cereals in Europe – *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 108, pp. 611–624.
- Boutigny, A. L., Ward, T. J., Van Coller, G. J., Flett, B., Lamprecht, S. C.** (2011). Analysis of the Fusarium graminearum species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference – *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 48, Issue. 9, pp. 914–920.

- Brodal, G., Hofgaard, I. S., Eriksen, G. S., Bernhoft, A., Sundheim, L.** (2016). Mycotoxins in organically versus conventionally produced cereal grains and some other crops in temperate regions. – *World Mycotoxin Journal*. Vol 9, pp 755–770.
- Browne, R. A., Cooke, B. M.** (2005). Resistance of wheat to *Fusarium* spp. in an in vitro seed germination assay and preliminary investigations into the relationship with *Fusarium* head blight resistance – *Euphytica*. Vol. 141, pp. 23–32
- Campbell, F. G., Crous, W. P., Lucas, A. J.** (1999). *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. – *Mycological Research*. Vol. 103, pp. 257–267.
- Champeil, A., Dore, T., Fourbet, J. F.** (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grain – *Plant Science*. Vol. 166, Issue. 6, pp. 1389–1415.
- Crops: Production – The Food and Agriculture Organization.
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (20.11.2020).
- Drakopoulos, D., Sulyok, M., Jenny, E., Kägi, A., Bänziger, I., Logrieco, A. F., Krska, R., Vogelgsang, S.** (2021). *Fusarium* Head Blight and Associated Mycotoxins in Grains and Straw of Barley: Influence of Agricultural Practices – *Agronomy*. Vol. 11, pp 1–23
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Mounier, A., Steinberg, C.** (2015). *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach – *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 111, pp. 64–71
- Eesti Taimekasvatuse Instituut. Taimekaitse. [veebileht]
<https://www.etki.ee/index.php/valdkonnad/taimekaitse#integreeritud-taimekaitse-suunised>
 (15.03.2021)
- Ellwood, S. R., Liu, Z., Syme, R. A., Lai, Z., Hane, J. K., Keiper, F., Moffat, C. S., Oliver, R. P., Friesen, T. L.** (2010). A First Genome Assembly of the Barley Fungal Pathogen *Pyrenophora teres* f. *teres* – *Genome Biology*. Vol. 11, No. R109.
- Fountaine, J. M., Shaw, M. W., Ward, E., Fraaije, B. A.** (2010). The Role of Seeds and Airborne Inoculum in the Initiation of Leaf Blotch (*Rhynchosporium secalis*) Epidemics in Winter Barley – *Plant Pathology*. Vol. 59, No. 2, pp. 330–37.
- FRAC Code List © 2020: Publications – *Fungicide Resistance Action Committee*.
https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2 (21.03.2021)
- Gardes, M., Bruns, T. D.** (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizas and rusts – *Molecular Ecology*. Vol. 2, No. 2, pp. 113–118.

- Ghazvini, H.** (2018). The host-pathogen interaction between barley and casual agent of spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) disease: a review – *Crop Breeding*. Vol. 8, Issue. 2, pp 1–15.
- Gjersten, P.** (1967). Gushing in beer: It's nature, cause and prevention – *Brewers Digest*. Vol. 42, No. 5, 80–84.
- Han, Q., Huang, L., Buchenauer, H., Wang, C., Kang, Z.** (2010). Cytological Study of Wheat Spike Infection by *Bipolaris sorokiniana* – *Journal of Phytopathology*. Vol. 158, Issue, 1. pp 22–29.
- Heinsoo, J., Jaama, E., Jõudu, J., Reimets, E., Viilberg, K.** (1986). *Taimekasvatus*. Tallinn: Valgus, 320 lk.
- Hollaway, G. J., Evans, M. L., Wallwork, H., Dyson, C. B., McKay, A. C.** (2013). Yield loss in cereals, caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, is related to fungal DNA in soil prior to planting, rainfall, and cereal type – *Plant Disease*. Vol. 97, No. 7, pp. 977–82.
- Hordeum spontaneum* K.Koch, *Linnaea* 21: 430 (1848): World Checklist of Selected Plant Families – *Royal Botanic Gardens*.
https://wcsp.science.kew.org/namedetail.do?name_id=419529 (25.02.2021)
- Illumäe, E., Hansson, A., Akk, E.** (2006). Põllukultuuride mõju ökoloogilises külvikorras mulla orgaanilise aine sisaldusele – *Taimekasvatus*. / Koost. J. Kadaja, Jüri; J. Siim, U. Tamm, H. Jõgeva: EMVI Teadustööde kogumik LXXI (71), AS Rebellis, lk 103–108.
- Jaama, E., Lauk, E.** (1999). *Teraviljakasvatuse käsiraamat*. Koost. H. Older. Saku: Eesti maaviljeluse Instituut, lk 32–33.
- Jayasena, K.W., Van Burgel, A., Tanaka, K., Majewski, J., Loughman, R.** (2007). Yield reduction in barley in relation to spot-type net blotch – *Australasian Plant Pathology*. Vol. 36, pp. 429–433.
- Jørgensen, L. N., Hovmøller, M. S., Hansen, J. G., Lassen, P., Clark, B.** (2014). IPM strategies and their dilemmas including an introduction to www.eurowheat.org. – *Journal of Integrative Agriculture*. Vol. 13, Issue. 2, pp. 265–281
- Jørgensen, L. N., Olsen, L. V.** (2007). Control of tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. – *Crop Protection*. Vol. 26, No. 11, pp. 1606–1616.
- Kangor, T., Tamm, Ü., Sooväli, P.** (2019). Biostimulaatori ja fungitsiidi mõju õlleodrale. – *Agronomia*. Koost. I. Tupits, S. Tamm, Ü. Tamm, A. Toe. Jõgeva: Vali Press, lk 149–154.
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A-K., Steinberg, C., Persson, P., Friberg, H.** (2016). Genus-Specific Primers for Study of *Fusarium* Communities in Field Samples – *American Society for Microbiology*. Vol. 82, No. 2, pp. 491–501
- Katsed: Katseandmete leht – Viljandi katsekeskus.
<https://pmk.agri.ee/viljandi2/katsed/otsing.php?lang=est> (13.03.2021)

- Kiiker, R., Juurik, M., Heick, T. M., Mäe, A.** (2021). Changes in DMI, SDHI, and QoI Fungicide Sensitivity in the Estonian *Zymoseptoria tritici* Population between 2019 and 2020 – *Microorganisms*. Vol. 9, No. 814, pp. 1-15
- Kiiker, R., Sooväli, P.** (2021). Taimehaiguste esinemisest teraviljapõldudel üleeestilise monitooringu tulemusel – *Agronomia 2021*. Koost. I. Tupits, Ü. Tamm, S. Tamm, A. Toe, E. Vanamb Jõgeva: Vali Press, lk 150–157.
- Kirinčić, S., Škrjanc, B., Kos, N., Kozolc, B., Pirnat, N., Tavčar-Kalcher, G.** (2015). Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia – Official Control of foods in the years 2008–2012. – *Food Control*. Vol. 50, pp. 157–165.
- KK2085** Turustatud taimekaitsevahendid toimeaine järgi: Põllumajanduskeskkonna näitajad – *Eesti Statistika andmebaas*.
<http://andmebaas.stat.ee/Index.aspx?lang=et&DataSetCode=KK2085#> (18.03.2021c)
- Koppel, M., Sooväli, P., Tarang, T.** (2011). Taimehaigused. Abiks teravilja ning rapsi haiguste määramisel. Jõgeva: OÜ Vali Press, 70 lk.
- Kumar, J., Schäfer, P., Hückelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., Nagarajan, S., Kogel, K-H.** (2002). Bipolaris Sorokiniana, a Cereal Pathogen of Global Concern: Cytological and Molecular Approaches towards Better Control – *Molecular Plant Pathology*. Vol. 3, No. 4, pp. 185–95.
- Kumar, K., Xi, K., Turkington, T. K., Tekauz, A., Helm, J. H., Tewari, J. P.** (2011). Evaluation of a detached leaf assay to measure fusarium head blight resistance components in barley – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 33, No. 3, pp. 364–374.
- Kumar, R., Gupta, A.,** (2020). Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management. Singapore: Springer, 871 pp.
- Lee, J. H., Won, H. J., Tran, P. H. N., Lee, S., Kim, H-Y., Jung, J. H.** (2021). Improving lignocellulosic biofuel production by CRISPR/Cas9-mediated lignin modification in barley – *GCB Bioenergy*. Vol. 13, Issue. 4, pp. 742–752.
- Leisova, L., Minarikova, V., Kucera, L., Ovesna, J.** (2006). Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR – *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 67, Issue. 3, pp. 446–455
- Leonard, K. J., Bushnell, W. R.** (2003). Fusarium head blight of wheat and barley, Minnesota: American Phytopathological Society, 512 pp.
- Liu, Z., Ellwood, S. R., Oliver, R. P., Friesen, T. L.** (2011). *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen – *Molecular Plant Pathology*. Vol. 12, Issue. 1, pp. 1–19
- Loit, K., Adamson, K., Bahram, M., Puusepp, R., Anslan, S., Kiiker, R., Drenkhan, R., Tedersoo, L.** (2019). Relative Performance of MinION (Oxford Nanopore Technologies)

- versus Sequel (Pacific Biosciences) ThirdGeneration Sequencing Instruments in Identification of Agricultural and Forest Fungal Pathogens. – *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 85, Issue. 21, pp. 1–20
- Lõiveke, H., Tammara, I.** (1995). Põllumajanduskultuuride haigused ja kahjurid ning nende tõrje – *Taimekaitse käsiraamat*. Koost. H. Lõiveke. Tallinn: Eesti Vabariigi Põllumajandusministeerium, lk. 82–107.
- Lõiveke, H.** (2008). Teraviljade fusarioosid Eestis. Saku: Eesti Maaviljeluse Instituut, 77 lk.
- Mahlein, A.-K.** (2016). Plant Disease Detection by Imaging Sensors – Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping – *Plant Disease*. Vol. 100, No. 2, pp. 241–251
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L. R., Davis, C. E., Dandekar, A. M.** (2015). Advanced methods of plant disease detection. – *Agronomy for Sustainable Development*. Vol. 35, Issue 1, pp. 1–25
- Mathre, D. E., Johnston, R. H., Grey, W. E.** (2001). Small Grain Cereal Seed Treatment. – *The Plant Health Instructor*.
- Matusinskaya, P., Freib, P., Mikolasovaa, R., Svacinovaa, I., Tvaruzeka, L., Spitzera, T.** (2010). Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. – *Crop Protection*. Vol. 29, Issue. 11, pp. 1325–1330
- McLean, M. S., Howlett, B. J., Hollaway, G. J.** (2009). Erratum to: Epidemiology and control of spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) of barley: a review – *Crop and Pasture Science*. Vol. 60, Issue. 5, pp. 499 – 499
- McNab, J. M., Smithard, R. R.** (1992). Barley β -glucan: An antinutritional factor in poultry nutrition – *Nutrition Research Reviews*. Vol. 5 pp. 45–60
- McRobert, N., Hughes, G., Savary, S.** (2003). Integrated approaches to understanding and control of diseases and pests in field crops. – *Australasian Plant Pathology*, Vol. 32, No. 14, pp. 167–180
- Mikhailova, A. L., Ternyuk, G. I., Mironenko, V. N.** (2010). *Pyrenophora teres*, an Agent Causing Wheat Leaf Spot. – *Mikologiya i Fitopatologiya*. Vol. 44, pp 63–69
- Milicevic, D. R., Skrinjar, M., Baltic, T.** (2010). Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety Control – *Toxins*. Vol. 2, pp. 572–592.
- Miller, J. D., Trenholm, H. L.** (1995). Mycotoxins in Grain: compounds other than aflatoxin. Minnesota: Eagan Press, 551 pp.

- Misra, AP.** (1979). Variability, physiologic specialization and genetics of pathogenicity in graminicolous *Helminthosporium* affecting cereal crops – *Indian Phytopathol.* Vol. 32, pp 1–22
- Mot'ková, P., Vytrásová, J.** (2011). Comparison of methods for isolating fungal DNA – *Czech Journal of Food Science.* Vol. 29, Issue. S76–S85.
- Mullastiku kaart – *Maa-ameti* *geoportaal.*
https://xgis.maaamet.ee/maps/XGis?app_id=MA29&user_id=at&LANG=1&WIDTH=980&HEIGHT=610&zlevel=5,516347.0304616,6551202.1117726 (14.03.2021)
- Murray, G. M., Brennan, J. P.** (2010). Estimating disease losses to the Australian barley Industry – *Australasian Plant. Pathology.* Vol. 39, pp. 85–96
- Mäe, A., Fillinger, S., Sooväli, P., Heick, T., M.** (2020). Fungicide Sensitivity Shifting of *Zymoseptoria tritici* in the Finnish-Baltic Region and a Novel Insertion in the MFS1 Promoter – *Frontiers in Plant Science.* Vol. 11, pp. 1–10
- Mäe, A., Sooväli, P., Põllumaa, L.** (2018). *Ramularia collo-cygni*: a new pathogen spreading in barley fields in Estonia. – *Agricultural and Food Science*, Vol. 27, No. 2, pp. 138–145
- Nameth, S. T.** (1998). Priorities in seed pathology research. – *Scientia agricola.*, Vol. 55, pp. 94–97
- Newton, A. C., Hackett, C. A.** (1994). Subjective components of mildew assessment on spring barley – *European Journal of Plant Pathology.* Vol. 100, pp. 395–412
- Nicolaisen, M., Justesen, A. F., Knorr, K., Wang, J., Pinnschmidt, H. O.** (2014). Fungal communities in wheat grain show significant co-existence patterns among species – *Fungal Ecology.* Vol. 11, pp. 145–153
- Nutter, F. W., Jr.** (2001). Disease assessment terms and concepts – *Encyclopedia of Plant Pathology.* Eds. O. C. Maloy, T. D. Murray. New York: John Wiley and Sons, pp. 312–323
- Nutter, F. W. Jr., Gleason, M. L., Jenco, J. H., Christians, N. C.** (1993). Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems – *Phytopathology.* Vol 83, No. 8, pp 806 – 812
- Oerke, E.-C.** (2006). Crop losses to pests – *The Journal of Agricultural Science.* Vol. 144, pp. 31–43
- Older, H.** (1999). Teraviljakasvatuse käsiraamat. Saku: Eesti Maaviljeluse Instituut, 137 lk.
- Parry, D. W., Jenkinson, P, McLeod, L.** (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals — a review – *Plant Pathology.* Vol. 44, Issue. 2, pp. 207–238
- Perello, E. A., Couretot, L., Curti, A., Uranga, P. J., Consolo, F. V.** (2019). First report of spot lesion of wheat caused by *Pyrenophora teres* f. sp *maculata* observed in Argentina. – *Crop Protection.* Vol. 122, pp 19–22

- Pereyra, S. A., Dill-Macky, R.** (2008). Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum – *Plant Disease*. Vol. 92, Issue. 5, pp. 800–807
- PM0281 Põllumajandusmaa ja -kultuurid maakonna järgi: Taimekasvatussaaduste tootmine – *Eesti Statistika andmebaas*. https://andmed.stat.ee/et/stat/majandus__pellumajandus__pellumajandussaaduste-tootmine__taimekasvatussaaduste-tootmine/PM0281 (25.02.2021)
- PM041: Põllukultuuride saagikus (1980–2017): Põllumajanduslike majapidamiste struktuur (1998. ja 2008. aasta metoodika) – *Eesti Statistika andmebaas*. https://andmed.stat.ee/et/stat/Lepetatud_tabelid__Majandus.%20Arhiiv__Pellumajandus.%20Arhiiv/PM041 (04.05.2021)
- Põllumajandusuuringute Keskus. Seemnekontrolli labori teenused. [veebileht] <https://pmk.agri.ee/et/laborid/seemnekontroll> (14.04.2021)
- Põllumasiivide veebikaart – *Põllumajandus registrite ja informatsiooni amet*. <https://kls.pria.ee/kaart/> (27.03.2021)
- Sarpeleh, A., Wallwork, H., Catcheside, D. E. A., Tate, M. E., Able, A. J.** (2007). Proteinaceous Metabolites from *Pyrenophora teres* Contribute to Symptom Development of Barley Net Blotch – *Phytopathology*, Vol. 97, No. 8, pp. 907–915
- Sooväli, P., Kann, L.** (2018) Põllukultuuride kahjustajad ja nende tõrje. Jõgeva: Trükikoda Paar, 55 lk
- Sooväli, P.** (2011). Probleemsemad teraviljahaigused 2010. A ja märkimisväärsed taime mõjutajad – *Efektiivne taimekasvatus*. Koost. Jõgeva Sordiaretuse Instituut. Jõgeva: AS Rebellis, lk 36–41.
- Sooväli, P., Koppel, M.** (2012). Internetipõhine I-Taimekaitse odrahaiguste tõrjel. – *Agronoomia*. Koost. A. Astover, L. Metspalu, R. Viiralt, K. Karp, R. Lauk, V. Rehema. Jõgeva: AS Rebellis, lk 181–186.
- Sooväli, P., Koppel, M.** (2017). Taimehaiguste monitooringu tulemused 2014.–2016. a. – *Taimekasvatuse alased uuringud Eestis 2017*. Koost. I. Tupits, S. Tamm, Ü. Tamm, A. Toe. Jõgeva: AS Rebellis, lk 139–146.
- Sooväli, P., Koppel, M., Sildoja K.** (2015). Biostimulaatori ja fungitsiidiga puhtimise mõju suvinisu saagile ja kvaliteedile 2013. ja 2014. aastal. – *Agronoomia*. Koost. M. Alaru, A. Astover, K. Karp, R. Viiralt, A. Must. Tartu: Ecoprint AS, lk 160–165.
- Sooväli, P., Runno-Paurson, E., Koppel, M.** (2007). Fungitsiidide vähendatud normide kasutamine teraviljahaiguste tõrjel. – *Millest sõltub teravilja saagikus* / Koost. Jõgeva Sordiaretuse Instituut. Jõgeva: OÜ Vali Press, lk 14–25

- Steddom, K., Bredehoeft, M. W., Khan, M., Rush, C. M.** (2005). Comparison of visual and multispectral radiometric disease evaluations of *Cercospora* leaf spot of sugar beet - *Plant Disease*. Vol. 89, No. 2, pp. 153 – 158
- Sousa, A. M., Pereira, M. O.** (2013). A prospect of current microbial diagnosis methods. – *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. /Ed. Mendes-Vilas, A. Vol. 3. Spain: Formatex Research Center, pp. 1429–1438.
- Suffert, F., Thompson, R. N.** (2018). Some reasons why the latent period should not always be considered constant over the course of a plant disease epidemic – *Plant Pathology*. Vol. 67, Issue. 9, pp. 1831–1840
- Syngenta. Sanette. [veebileht] <https://www.syngenta.ee/product/seed/sanette> (14.03.2021)
- Zearfoss, A. D., Cowger, C., Ojiambo, P. S.** (2011). A Degree-Day Model for the Latent Period of *Stagonospora nodorum* Blotch in Winter Wheat – *Plant Disease*. Vol. 95, No. 5, pp. 561–567
- Zhaohui, L., Ellwood, R. S., Oliver, P. R., Friesen, L. T.** (2011). *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. – *Molecular Plant Pathology*. Vol. 12, pp 1–19.
- Zhukova, L. V., Stankevych, S. V., Turenko, V. P., Bezpalko, V. V., Zabrodina, I. V., Bondarenko, S. V., Poedinceva, A. A., Golovan, L. V., Klymenko, I. V., Melenti, V. O.** (2019). Root rots of spring barley, their harmfulness and the Basic effective protection measures – *Ukrainian Journal of Ecology*. Vol. 9, Issue. 2, pp. 232–238.
- Tamm, Ü.** (2007). Odra omadused, kasvatamise iseärasused ja enamlevinud sordid – *Millest sõltub teravilja saagikus*. Koost. Jõgeva Sordiaretuse Instituut. Jõgeva: OÜ Vali Press, lk 26–35.
- Taimekaitse vahendite register: Taimekaitse. – *Põllumajandus- ja Toiduamet*. <https://portaal.agri.ee/avalik/#/taimekaitse/taimekaitsevahendid-otsing/et> (12.03.2021)
- Teravilja- ja õlikultuuride turg IV kvartal 2019. (2021). Tallinn: Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoda. <https://epkk.ee/wp-content/uploads/2020/03/Teraturg-IV-kv19.pdf> (25.02.2021).
- The Agriculture and Horticulture Development Board. Fusarium and microdochium in cereals. [veebileht] <https://ahdb.org.uk/knowledge-library/fusarium-and-microdochium-in-cereals> (15.04.2021)
- The Agriculture and Horticulture Development Board. Fusarium and microdochium in cereals. [veebileht] <https://ahdb.org.uk/netblotch> (27.04.2021)
- The American Phytopathological Society. Fusarium head blight (FHB) or scab. [veebileht] <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/Fusarium.aspx> (15.04.2021)
- Thirugnanasambandam, A., Wright, K. M., Atkins, S. D., Whisson, S. C., Newton, A. C.** (2011). Infection of Rrs1 Barley by an Incompatible Race of the Fungus *Rhynchosporium*

- Secalis Expressing the Green Fluorescent Protein – *Plant Pathology*. Vol. 60, No. 3, pp. 513–21.
- Trail, F., Xu, J. R., San Miguel, P., Halgren, R. G., Kistler, H. C.** (2003). Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*) – *Fungal Genetics and Biology*. Biol Vol. 38, Issue. 2, pp. 187–197.
- Ullrich, S. E.** (2011). Barley: Production, improvement, and uses. UK: Blackwell Publishing Ltd, 661 pp.
- Urb, K.** (2014) Kuidas kasvasid härja Wolmari? – Põllumajandus.ee [e-ajakiri] <https://www.pollumajandus.ee/uudised/2014/09/19/kuidas-kasvasid-harra-wolmari-3> (14.03.2021)
- van Elsas, J. D., Duarte, G. F., Keijzer-Wolters, A. C., Smit, E.** (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 43, 133–151.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics – *Mycologia*. Vol. 82, No. 2, pp. 315–322.
- Wiese, M. V.** (1987). Compendium of Wheat Diseases, Minnesota: American Phytopathological Society, 112 pp.
- Williams, K., Donnellan, S., Smyl, C., Scott, L., Wallwork, H.** (2003). Molecular Variation in *Rhynchosporium Secalis* Isolates Obtained from Hotspots – *Australasian Plant Pathology*. Vol. 32, No. 2, pp. 257–262.

LISAD

Lisa 1. Uurimistöösse kaasatud 2018.–2020. aastate seemneproovide päritolu suviadra põllumassiivide kaart



Allikas: Maa-ameti geoportaal 2021

Lisa 2. Suviodrasortide haiguskindlus sordikirjelduse ja katseandmete alusel

'Aukusti' (Boreal, FIN)
'Aukustil' on hea vastupidavus äärislaiksusele ja jahukastele (Avispeamees 2021). 2016.–2017. aastatel hinnati Viljandi katsekeskuse katsejaamade keskmisena 'Aukusti' nakatumist 1–9 skaalal võrklaiksusesse 2,8 palli, äärislaiksusesse 1,1 palli ja kõrreliste pruunlaiksusesse 2,6 palli (Viljandi katsekeskus 2021). Soome Loodusvarade Instituudi (LUKE) 2013.–2020. aastate katseandmete põhjal esines keskmiselt äärislaiksust 4,0 %, pruunlaiksust 11,2 % ja võrklaiksust 17,1 % (LUKE 2021).
'Iron' (Nordic Seeds, DK)
'Iron' on söödaodra kasvatamiseks aretatud sort (Baltic Agro 2021). Ta on vähem vastuvõtlik äärislaiksusele (<i>Rhynchosporium commune</i>), võrklaiksusele (<i>P. teres f. maculata</i>) ning triiptõvele (<i>P. graminea</i>) (Baltic Agro 2021). Väiksem vastupanuvõime on aga pruunlaiksuse (<i>Bipolaris sorokiniana</i>) suhtes (Baltic Agro 2021). Viljandi katsekeskuse andmetest selgub, et Eestis on olnud 'Ironi' nakatumine 2008.–2020. aastatel võrklaiksusesse 2,4 palli, äärislaiksusesse 1,2 palli ja kõrreliste pruunlaiksusesse 2,5 palli (Viljandi katsekeskus 2021).
'Katniss' (Nordic Seeds, DK)
Sordiomadustelt on 'Katniss' vastuvõtlikum pruunlaiksuse haigustekitaja suhtes ning sort on haiguskindlam jahukaste, äärislaiksuse, võrklaiksuse ja triiptõve suhtes (Baltic Agro 2021). 'Katnissi' nakatumine on Eestis olnud võrklaiksusesse 2,2 palli, äärislaiksusesse 1,1 palli ja kõrreliste pruunlaiksusesse 2,3 palli, selgub 2015.–2020. aastate katseandmete põhjal (Viljandi katsekeskus 2021).
'Sanette' (Sygenta, UK)
'Sanette' on õlleodra sort, mis oli 2014. aastal Põllumajanduse ja aianduse arendusameti (AHDB) nimekirjas kõige saagikam sort (Sygenta 2021). Ta on aretatud resistentseks jahukaste suhtes ning tal on hea vastupanuvõime äärislaiksusele (Sygenta 2021). Sort on vastuvõtlikum võrklaiksuse suhtes (Sygenta 2021). Sanette haigestumusnäitajad on olnud keskmiselt võrklaiksusesse 2,5 palli, äärislaiksusesse 1,0 palli ja kõrreliste

<p>pruunlaiksusesse 3,0 palli, selgub 2012.– 2016. aastate katseandmetest (Viljandi katsekeskus 2021).</p>
<p>'Wolmari' (Boreal, FIN)</p>
<p>'Wolmari' toodi turule 2014. aastal ning sai põllumeeste seas kiiresti tuntuks varajase valmimise ja hea saagikuse poolest (Kuidas kasvasid... 2014). 'Wolmari' on võrreldes teiste varajaste suviodrasortidega vähem vastuvõtlikum võrklaiksuse suhtes. Samuti on sort vastupidavam ka äärislaiksusele (Boreal 2021). 'Wolmari' keskmised nakatumisnäitajad Eestis on 2015. aastal ja 2017.– 2019. aastatel olnud võrklaiksusesse 2,1 palli, äärislaiksusesse 1,1 palli ja kõrreliste pruunlaiksusesse 2,3 palli (Viljandi katsekeskus 2021). Soome katseandmete (2013.– 2020. a) keskmisena esines 'Wolmaril' nakatumist äärislaiksusesse 7,8 % ja võrklaiksusesse 10,7 % (LUKE 2021).</p>
<p>'Vertti' (Boreal, FIN)</p>
<p>Sordil on hea vastupanuvõime võrklaiksuse ja äärislaiksuse suhtes ning vastuvõtlikum jahukaste suhtes (Boreal 2021). LUKE katseandmete põhjal esines 2013.– 2020. aastatel suviodral 'Vertti' keskmiselt nakatumist äärislaiksusesse 6,4 %, pruunlaiksusesse 3,6 % ja võrklaiksusesse 3,7 % (LUKE 2021).</p>

Lisa 3. Uuringusse kaasatud seemneproovide andmed

Proov	Aasta	Sort	Põllumasiiv	Mulla šiffer	Sümptomid	Idanevus, %
1	2019	Aukusti	67158422855	Ko;KI	asüptomaatiline	100
2	2019	Vertti	67058664668	K;Ko	asüptomaatiline	97
3	2019	Iron	68459355822	Ko;K	üksikud tumenenud terad	96
4	2019	Katniss	68859063198	KI;LkI	tumenenud terad	62
5	2019	Sanette	69159440685	KI;Kh``	tumenenud terad	94
6	2019	Sanette	68958918388	KI;K	tumenenud terad	90
7	2019	Wolmari	69359421246	KI	tumenenud terad	89
8	2019	Wolmari	68259256807	Kh``;Kh``g	tumenenud terad	65
9	2019	Wolmari	69459450505	Kh``;Kor	tumenenud terad	83
10	2019	Wolmari	69159334979	Ko	üksikud tumenenud terad	88
11	2020	Wolmari	69159314246	Ko	asüptomaatiline	90
12	2020	Wolmari	67058950669	Kh``	asüptomaatiline	90
13	2020	Katniss	66758631152	Gk	tumenenud terad	58
14	2020	Katniss	66758540842	GI;Kg	üksikud roosad terad	59
19	2018	Wolmari	69259319637	KI;Kor	asüptomaatiline	93
20	2018	Sanette	69459450505	Kh``;Kor	asüptomaatiline	91

Lisa 4. DNA eraldamise protokollid

DNA eraldamise protokoll CTAB metoodikaga
1. Purusta proovid ühe kuulikesega QIAGEN TissueLyserII masinas 25000 1/s 5 min
2. Tsentrifuugi 4000xg 2 min
3. Lisa 1 ml CTAB puhvrit, vortex
4. Inkubeeri proove 60°C juures 30 min
5. Tsentrifuugi 4000xg 15 min
6. Pipeteeri supernatant 200 µl uude tuubi
7. Lisa 200 µl isopropanooli (+4°C), raputa
8. Inkubeeri -20°C 15 min
9. Tsentrifuugi 4000xg 15 min
10. Eemalda supernatant
11. Pese sade 200 µl 70% etanooliga (+4°C), suspendeeri 2x
12. Tsentrifuugi 4000xg 10 min
13. Eemalda supernatant
14. Kuivata sade 60°C kapis 20 min
15. Lahusta sade 50 µl H ₂ O
DNA PUHASTAMINE DNA Clean & Concentrator komplektiga (Zymo Research, CA, USA)
16. Lisa mikrotsentrifuugi tuubi 200 µl DNA siduvat puhvrit, vortex
17. Pipeteeri supernatant Zymo-Spin kolonn kogumistuubil.
18. Tsentrifuugi 30 sek
19. Viska läbifiltreerunud vedelik ära
20. Lisa 200 µl DNA pesu puhvrit tuubi
21. Tsentrifuugi 30 sek, korda DNA väljapesu etappi
22. Lisa 10 µl DNA elueerimis puhvrit (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM EDTA) kolonnile
23. Inkubeeri toatemperatuuril 1 min
24. Vii kolonn mikrotsentrifuugi tuubi
25. Tsentrifuugi 30 sek
26. DNA lahus on mikrotsentrifuugituubis

Qiagen DNeasy Plant Mini Kit protokoll DNA eraldamiseks
<ol style="list-style-type: none"> 1. Lisa 400 µl puhver AP1 ja 4 µl RNase A (4°C kapis), vortex 2. Inkubeeri 10 min 65°C. Pööra tuubi 2-3 korda, vortex 3. Lisa 130 µl puhver P3, vortex 4. Hoia 5 min jääl 5. Tsentrifuugi 5 min 20000 xg 6. Pipeteeri lüsaat QIAshredder spinkolonni 2 ml tuubi peal 7. Tsentrifuugi 2 min 20000 xg 8. Pipeteeri lüsaat uude kaanega tuubi 9. Lisa 600 µl puhver AW1, vortex 10. Pipeteeri 600 µl segu DNeasy Mini spinkolonnile 2 ml tuubi peal 11. Tsentrifuugi 1 min 6000 xg (Etappe 10. ja 11. korrati kuni kogu segu oli läbi filtreeritud) 12. Viska läbivoolanud vedelik minema 13. Tsentrifuugi 1 min 6000 xg 14. Pipeteeri ülejäänud segu DNeasy Mini spinkolonnile 2 ml tuubi peal 15. Tsentrifuugi 1 min 6000 xg 16. Aseta spinkolonn uuele kaaneta 2 ml tuubile 17. Lisa 500 µl puhver AW2 18. Tsentrifuugi 1 min 6000 xg 19. Viska läbivoolanud vedelik minema 20. Lisa uuesti 500 µl puhver AW2 21. Tsentrifuugi 1 min 6000 xg 22. Viska läbivoolanud vedelik minema 23. Tsentrifuugi 2 min 20000 xg 24. Aseta spinkolonn uuele 2 ml kaaneta tuubile 25. Pipeteeri filtrile 50 µl elueerimispuhvrit AE 26. Inkubeeri 5 min toatemperatuuril 27. Tsentrifuugi 1 min 20000 xg 28. Pipeteeri filtrile 50 µl elueerimispuhvrit AE 29. Inkubeeri 5 min toatemperatuuril 30. Tsentrifuugi 1 min 20000 xg 31. DNA lahus on mikrotsentrifuugituubis.

DNA eraldamise protokoll Solis BioDyne 10x lüüsilahusega (0,8M TrisHCl; 0,2M (NH₄)₂SO₄; 0,2% Tween20)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Lisa 100 µl lüüsilahust (või rohkem, et kogu bioloogiline materjal oleks kaetud) 2. 2,5 µl ProteinaseK (20 mg/ml) 3. Inkubeerida 56°C juures raputil 500 rpm 6 tundi 4. Inkubeerida 98°C juures 15 minutit (inaktiveerib proteinaas K) 5. Tsentrifuugi 2-3 minuti 11000 rpm 6. Pipeteeri u 80 µl DNA lahust uude tuubi 7. Tee DNA lahusest 10x lahjendus TE puhvrts

Lisa 5. DNA kontsentratsioonid ja erinevate lainepikkuste vahelised suhtarvud eraldusmetoodikate lõikes

Proov	CTAB			QIAGEN			SOLIS		
	Keskmine kontsentratsioon	Puhtus 260/280	Puhtus 260/230	Keskmine kontsentratsioon	Puhtus 260/280	Puhtus 260/230	Keskmine kontsentratsioon	Puhtus 260/280	Puhtus 260/230
1	60,80	1,99	1,87	66,05	1,84	1,80	66,45	1,10	0,35
2	46,45	1,94	1,79	53,40	1,81	2,11	93,85	1,26	0,36
3	95,40	1,91	1,77	70,70	1,84	1,86	95,80	1,14	0,41
4	101,00	1,91	1,49	69,40	1,88	1,62	188,80	1,26	0,48
5	78,25	1,98	1,84	50,65	1,80	1,43	101,65	1,16	0,42
6	72,85	1,98	1,78	43,90	1,83	1,61	105,70	1,22	0,42
7	142,70	1,99	1,82	31,15	1,85	1,95	135,10	1,22	0,45
8	84,05	1,82	1,19	65,00	1,87	1,89	164,05	1,31	0,47
9	69,80	1,98	1,63	24,60	1,74	1,36	93,60	1,27	0,42
10	83,80	2,00	1,53	33,40	1,82	1,93	147,05	1,37	0,47
11	NA	NA	NA	44,00	1,72	1,21	82,70	1,12	0,42
12	NA	NA	NA	110,80	1,89	1,61	295,50	1,22	0,51
13	NA	NA	NA	16,85	3,01	0,28	186,55	1,17	0,44
14	21,65	1,19	0,30	32,20	2,07	0,61	147,15	1,13	0,42
19	NA	NA	NA	39,30	1,75	1,66	217,40	1,33	0,50
20	NA	NA	NA	79,65	1,79	1,70	364,40	1,30	0,55

Lisa 6. Haigustekitajate esinemise sagedustabel erinevate DNA eraldusmetoodikate alusel

Proov	DNA eraldamise metoodika	ITS	<i>P. teres</i>	<i>Fusarium</i> spp.
1	CTAB	JAH	EI	EI
	QIAGEN	JAH	EI	EI
	SOLIS	JAH	JAH	JAH
2	CTAB	JAH	EI	EI
	QIAGEN	JAH	EI	EI
	SOLIS	JAH	EI	EI
3	CTAB	JAH	EI	JAH
	QIAGEN	JAH	EI	JAH
	SOLIS	JAH	EI	EI
4	CTAB	JAH	EI	JAH
	QIAGEN	JAH	EI	JAH
	SOLIS	JAH	EI	EI
5	CTAB	JAH	JAH	JAH
	QIAGEN	JAH	JAH	EI
	SOLIS	JAH	JAH	JAH
6	CTAB	JAH	JAH	JAH
	QIAGEN	JAH	JAH	JAH
	SOLIS	JAH	JAH	JAH
7	CTAB	JAH	EI	EI
	QIAGEN	JAH	EI	JAH
	SOLIS	JAH	JAH	EI
8	CTAB	JAH	EI	JAH
	QIAGEN	JAH	EI	JAH
	SOLIS	JAH	EI	EI
9	CTAB	JAH	EI	JAH
	QIAGEN	JAH	JAH	JAH
	SOLIS	JAH	EI	EI
10	CTAB	JAH	EI	JAH
	QIAGEN	JAH	JAH	EI
	SOLIS	JAH	JAH	EI
11	CTAB	EI	EI	EI
	QIAGEN	JAH	EI	JAH
	SOLIS	JAH	JAH	JAH

Proov	DNA eraldamise metoodika	ITS	<i>P. teres</i>	<i>Fusarium</i> spp.
12	CTAB	EI	EI	EI
	QIAGEN	JAH	JAH	JAH
	SOLIS	JAH	JAH	EI
13	CTAB	EI	EI	EI
	QIAGEN	JAH	EI	JAH
	SOLIS	JAH	EI	JAH
14	CTAB	JAH	EI	JAH
	QIAGEN	JAH	EI	JAH
	SOLIS	JAH	JAH	JAH
19	CTAB	EI	EI	EI
	QIAGEN	JAH	JAH	JAH
	SOLIS	JAH	EI	JAH
20	CTAB	EI	EI	EI
	QIAGEN	JAH	JAH	EI
	SOLIS	JAH	JAH	EI

Lisa 7. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Ülari Vent,
(sünnipäev 22/08/1996 39608222730)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö
SUVIDRA (*HORDEUM VULGARE* L.) SEEMNETES SÄILIVATE
FÜTOPATOGEENSETE SEENTE TUVASTAMINE,
mille juhendaja on Riinu Kiiker *PhD* ja Kaire Loit *MSc*,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____/digiallkirjastatud/_____
allkiri

Tartu, 21.05.2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Riinu Kiiker /digiallkirjastatud/
(juhendaja nimi ja allkiri)

21.05.2021
(kuupäev)

Kaire Loit /digiallkirjastatud/
(juhendaja nimi ja allkiri)

21.05.2021
(kuupäev)